

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GILBERTO MELNICK

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO E BIOCOMPATIBILIDADE DE LONGO PRAZO  
DE UMA NOVA PLATAFORMA VASCULAR BIOABSORVÍVEL PARA ARTÉRIAS  
PERIFÉRICAS: ESTUDO PILOTO DE TRÊS ANOS EM PORCOS YUCATAN.

CURITIBA  
2020

GILBERTO MELNICK

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO E BIOCOMPATIBILIDADE DE LONGO PRAZO  
DE UMA NOVA PLATAFORMA VASCULAR BIOABSORVÍVEL PARA ARTÉRIAS  
PERIFÉRICAS: ESTUDO PILOTO DE TRÊS ANOS EM PORCOS YUCATAN.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Grau Acadêmico de Doutor em Medicina Interna.

Orientador: Dr. Ênio Eduardo Guérios

Coordenador: Dr. Emilton Lima Júnior

CURITIBA  
2020

M525 Melnick, Gilberto

Avaliação do desempenho e biocompatibilidade de longo prazo de uma nova plataforma vascular bioabsorvível para artérias periféricas: estudo piloto de três anos em porcos Yucatan [recurso eletrônico] / Gilberto Melnick. – Curitiba, 2020.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ênio Eduardo Guérios

1. Prótese vascular. 2. Experimentação animal.  
3. Artérias – Fisiopatologia. I. Guérios, Ênio Eduardo. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLM: WG 170

ATA Nº018

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

No dia um de outubro de dois mil e vinte às 08:30 horas, na sala <https://bit.ly/3jAiaFB>, MICROSOFT TEAMS, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **GILBERTO MELNICK**, intitulada: **AValiação DO DESEMPENHO E BIOCOMPATIBILIDADE DE LONGO PRAZO DE UMA NOVA PLATAFORMA VASCULAR BIOABSORVÍVEL PARA ARTÉRIAS PERIFÉRICAS: ESTUDO PILOTO DE TRÊS ANOS EM PORCOS YUCATAN.**, sob orientação do Prof. ÊNIO EDUARDO GUERIOS. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ÊNIO EDUARDO GUERIOS, LUCIA DE NORONHA (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA), CÉLIO TEIXEIRA MENDONÇA (DEPARTAMENTO DE CLÍNICA CIRÚRGICA), PIERRE GALVAGNI SILVEIRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), MARCELO DE PAULA LOUREIRO (UNIVERSIDADE POSITIVO). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ÊNIO EDUARDO GUERIOS, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 01 de Outubro de 2020.

Assinatura Eletrônica

01/10/2020 17:40:20.0

ÊNIO EDUARDO GUERIOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/10/2020 18:59:38.0

LUCIA DE NORONHA

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA)

Assinatura Eletrônica

06/10/2020 00:07:19.0

CÉLIO TEIXEIRA MENDONÇA

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE CLÍNICA CIRÚRGICA)

Assinatura Eletrônica

01/10/2020 15:09:24.0

PIERRE GALVAGNI SILVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

05/10/2020 11:01:38.0

MARCELO DE PAULA LOUREIRO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GILBERTO MELNICK** intitulada: **AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO E BIOCOMPATIBILIDADE DE LONGO PRAZO DE UMA NOVA PLATAFORMA VASCULAR BIOABSORVÍVEL PARA ARTÉRIAS PERIFÉRICAS: ESTUDO PILOTO DE TRÊS ANOS EM PORCOS YUCATAN.**, sob orientação do Prof. ÊNIO EDUARDO GUERIOS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Outubro de 2020.

Assinatura Eletrônica

01/10/2020 17:40:20.0

ÊNIO EDUARDO GUERIOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/10/2020 18:59:38.0

LUCIA DE NORONHA

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA)

Assinatura Eletrônica

06/10/2020 00:07:19.0

CÉLIO TEIXEIRA MENDONÇA

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE CLÍNICA CIRÚRGICA)

Assinatura Eletrônica

01/10/2020 15:09:24.0

PIERRE GALVAGNI SILVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

05/10/2020 11:01:38.0

MARCELO DE PAULA LOUREIRO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Dedico esta tese aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dra. IARA JOSÉ DE MESSIAS REASON, ex-coordenadora da Pós-Graduação em Medicina Interna do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela confiança e apoio irrestrito durante minha permanência no Programa de Pós-Graduação.

Ao meu orientador e amigo, Dr. ÊNIO EDUARDO GUÉRIOS, que acreditou em meu potencial inventivo e me trouxe novamente à vida acadêmica.

A TODA A EQUIPE de colaboradores do CRF Skirball Center for Innovation (Oranburg, NY - EUA), em especial ATHANASIOS PEPPAS, GERARD CONDITT e YANPING CHENG pela troca diária de experiências profissionais e pessoais no ano de 2018 durante meu programa de *Research Fellowship*.

Aos meus mentores e amigos Dr. JUAN GRANADA e Dr. GREG KALUSZA pela contribuição técnica e por me guiarem no aprofundamento de meus conhecimentos no mundo da inovação em dispositivos médicos.

Ao amigo e parceiro de *fellowship* Dr. MARCO FERRONE com quem dividi longas jornadas de trabalho pesado e que me ajudou a manter a sensação que preservo de que ainda sou jovem.

Às minhas irmãs, LORENA (*in memoriam*), ELIANE e SHEILA, por dividirem suas infâncias comigo e de alguma forma expressarem seu orgulho em minha pessoa.

Aos meus meninos, HENRIQUE e MICHEL, por me ensinarem a ser pai.

À minha esposa, ANA PAULA, por me dar a oportunidade de compartilhar sua vida, me encorajar, apoiar e elevar meu espírito.

*I have not failed. I've just found ten thousand ways  
that don't work.*

*Thomas A. Edison*

## RESUMO

**Objetivos:** Artérias periféricas estão constantemente expostas a deformações (alongamentos, torções, encurtamentos e compressões) fazendo com que plataformas vasculares bioabsorvíveis (BRS) sejam consideradas uma alternativa potencialmente atraente de tratamento em comparação a *stents* metálicos. Conduzimos um estudo piloto pré-clínico de longo prazo de uma nova BRS eluidora de sirolimus em artérias periféricas.

**Métodos e Resultados:** Quatorze (14) BRS foram implantados em artérias iliofemorais de sete (7) porcos Yucatan (2 plataformas para cada animal) e avaliados com técnicas de imagem, farmacocinética, histopatologia e degradação de polímeros em 0, 30, 90, 180 dias, 1, 2 e 3 anos. A perda angiográfica luminal tardia manteve-se inalterada aos 30 e 180 dias mas decaiu significativamente do primeiro ao terceiro ano. A Tomografia de Coerência Óptica (OCT) demonstrou aumento tardio da área luminal (1 ano:  $14,70 \pm 3,58 \text{ mm}^2$ , 2 anos  $22,04 \pm 3,81 \text{ mm}^2$  e 3 anos  $23,45 \pm 7,07 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0,05$ ) primariamente devido ao alargamento da área do BRS entre 1 e 3 anos, enquanto que não houve diferença na porcentagem da área de estenose em todos os tempos avaliados. Evidências histológicas de degradação das plataformas foram observadas ao início de 2 anos, com nenhuma ou mínima reação inflamatória. Aos 3 anos as estruturas dos BRS foram raramente discerníveis pela OCT, o que foi confirmado pela quase completa degradação do polímero na análise de peso molecular.

**Conclusões:** Neste estudo piloto, um novo BRS eluidor de sirolimus demonstrou promissores desempenhos agudos e crônicos em artérias iliofemorais de porcos Yucatan.

**KEYWORDS:** plataforma bioabsorvível, periférica, animal, histopatologia, imagem.

## ABSTRACT

**Aims:** Peripheral arteries are constantly exposed to deformation (elongation, twisting, shortening, compression) making bioresorbable scaffolds (BRS) a potentially attractive therapeutic alternative to metallic stents. We conducted a long-term pilot preclinical study of a novel sirolimus-eluting BRS in peripheral arteries.

**Methods and Results:** 14 BRS were deployed in iliofemoral arteries of 7 healthy Yucatan miniswine (2 scaffolds per animal) and examined with imaging, pharmacokinetic, histopathologic, and polymer degradation techniques at 0, 30, 90, 180 days, 1, 2 and 3 years. Angiographic late luminal loss remained unchanged at 30 and 180 days but significantly decreased from 1 to 3 years. OCT showed late increase in lumen area (1 Year:  $14.70 \pm 3.58 \text{ mm}^2$ , 2 years  $22.04 \pm 3.81 \text{ mm}^2$  and 3 years  $23.45 \pm 7.07 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0.05$ ) primarily due to scaffold area enlargement between 1 and 3 years, while there was no difference in the percent area stenosis at all time points. Histologic evidence of scaffold degradation was observed starting at 2 years, with no or minimal inflammation reaction. At 3 years, BRS struts were rarely discernible by OCT, confirmed by a nearly complete polymer degradation by molecular weight analysis.

**Conclusions:** In this pilot study, novel sirolimus-eluting BRS showed promising acute and chronic performance in the iliofemoral arteries of Yucatan miniswine.

**KEYWORDS:** bioresorbable scaffold, peripheral, animal, histopathology, imaging.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BRS –</b>	Plataforma Vascular Bioabsorvível
<b>OCT –</b>	Tomografia de Coerência Óptica
<b>DAP –</b>	Doença arterial periférica
<b>ATP –</b>	Angioplastia Transluminal Percutânea
<b>DEB –</b>	Balão Eluidor de Droga
<b>PLLA –</b>	Poliácido L-Láctico
<b>PDLA –</b>	Poliácido D,L-Láctico
<b>TRV –</b>	Terapia de Restauração Vascular
<b>DES –</b>	<i>Stent</i> Eluidor de Droga
<b>TCA –</b>	Tempo de Coagulação Ativada
<b>QVA –</b>	Angiografia Vascular Quantitativa
<b>CL-EM –</b>	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa
<b>GPC –</b>	Cromatografia de Permeação em Gel
<b>H&amp;E –</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>ET –</b>	Tricrômico de Elastina
<b>LEI –</b>	Lâmina Elástica Interna
<b>LEE –</b>	Lâmina Elástica Externa
<b>AL –</b>	Área Luminal
<b>NA –</b>	Área Neointimal
<b>AM –</b>	Área média
<b>DL –</b>	Diâmetro Equivalente Luminal



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>09</b>
<b>2 BIOPOLÍMEROS ABSORVÍVEIS .....</b>	<b>11</b>
<b>3 PLATAFORMAS VASCULARES ABSORVÍVEIS .....</b>	<b>12</b>
3.1 Biocompatibilidade .....	13
3.2 Farmacocinética do sirolimus .....	15
<b>4 TERAPIA DE RESTAURAÇÃO VASCULAR .....</b>	<b>16</b>
4.1 Revascularização .....	18
4.2 Restauração .....	18
4.3 Reabsorção .....	19
<b>5 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
6.1 Descrição do dispositivo investigado .....	20
6.2 Desenho do Estudo .....	21
6.3 Procedimento Intervencionista .....	21
6.4 Farmacocinética .....	23
6.5 Angiografia Vascular Quantitativa .....	23
6.6 Tomografia de Coerência Óptica .....	25
6.7 Análise Histológica .....	27
6.8 Análise de Peso Molecular .....	31
<b>7 RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A prevalência populacional global de doença arterial periférica (DAP) é entre 3 a 12%<sup>1, 2</sup>. Estima-se que 8,5 milhões de indivíduos são afetados pela doença na América do Norte, e 202 milhões globalmente<sup>3</sup>.

Pacientes portadores de DAP que não apresentam resposta adequada a orientações clínicas associadas a terapia farmacológica, e que tenham lesões com características apropriadas para abordagem intervencionista têm mostrado excelentes resultados com terapêutica endovascular nos quesitos qualidade de vida e desfechos clínicos<sup>4</sup>.

Em comparação com a angioplastia transluminal percutânea com balões convencionais (ATP), a utilização de balões eluidores de paclitaxel (DEB) reduzem significativamente a perda luminal tardia, o risco de reestenose binária e a necessidade de revascularização da lesão alvo<sup>5-8</sup>. Portanto, seu uso na prática clínica passou a ser o tratamento de escolha para doença fêmoro-poplítea combinado ou não com implante de *stents* auto-expansíveis de nitinol. Entretanto, uma revisão sistemática publicada recentemente concluiu que existe um risco aumentado de morte relacionado ao uso de dispositivos eluidores de paclitaxel (balões e *stents*) em território fêmoro-poplíteo<sup>9</sup>. Mais adiante, refutando este trabalho, uma meta-análise demonstrou discordância com aquela afirmativa<sup>10</sup>, gerando grande discussão e insegurança dentro da comunidade de intervencionistas. Fazem-se portanto necessários mais estudos de investigação para a definição da real relação risco-benefício do uso destes dispositivos no tratamento da DAP fêmoro-poplítea.

Conforme a complexidade (calcificação e tortuosidades) e extensão das lesões (>10 mm) em território fêmoro-poplíteo, ou mesmo em casos de oclusão crônica,

*stents* passaram a ser alternativa terapêutica atraente no tratamento endovascular da DAP, demonstrando resultados melhores que a ATP. Mesmo assim, estes resultados estão aquém do ideal, havendo um índice de patência de apenas 60% em 3 anos. Note-se ainda que este resultado é demonstrado com o uso de *stents* auto-expansíveis de nitinol, contra resultados ainda menos expressivos com *stents* expansíveis por balão. Atualmente há apenas dois *stents* dedicados para uso em território fêmoro-poplíteo disponíveis no mercados brasileiro e americano. Em vista do resultado terapêutico ainda aquém do ideal (patência do vaso tratado de 60% em 3 anos), a ideia de implantar dispositivos que não deixam metal na artéria vem se consolidando como uma possível solução para a reestenose e reoclusão frequentes após o implante de *stents* metálicos<sup>11</sup>.

Outras modalidades de tratamento incluem aterectomia direcional, aterectomia a laser e crioplastia. Nenhuma delas demonstrou superioridade em comparação com ATP, o que as definiu como terapias de apoio e alternativas complementares<sup>12-14</sup>.

Mais recentemente, o uso em humanos de plataformas vasculares bioabsorvíveis não-dedicadas em doença fêmoro-poplíteia demonstrou que o resultado angiográfico imediato é comparável aos resultados com *stents* metálicos, mas mudanças técnicas nas características daqueles dispositivos são necessárias com o objetivo de se reduzir índices de reestenose durante o período de absorção da plataforma<sup>15-17</sup>.

A despeito de alta trombogenicidade e consequentes eventos adversos demonstrados em ensaios clínicos<sup>18,19</sup> da primeira plataforma vascular bioabsorvível testada na circulação coronariana, ainda se acredita e justifica-se extrapolar que, plataformas vasculares bioabsorvíveis atuando como suporte mecânico transitório durante o processo de restauração arterial, teriam benefícios adicionais em

comparação com *stents* farmacológicos em território vascular periférico. O retorno de vasos tratados para um estado mais fisiológico, com recuperação vasomotora e elástica e maior ganho luminal final<sup>20</sup> são características que podem teoricamente acarretar vantagens no campo do tratamento percutâneo da DAP.

## 2 BIOPOLÍMEROS ABSORVÍVEIS

O uso de materiais bioabsorvíveis foi introduzido na medicina há cerca de seis décadas com fios de sutura<sup>21</sup>. Dentre estes materiais, o poliácido lático e seus derivados (poliésteres alifáticos) (Tabela 1) foram os mais explorados na confecção de dispositivos para uso em humanos devido a suas versatilidades e características de adaptação a meios biológicos, sendo hoje amplamente aplicados em terapias ortopédicas, cardiovasculares e de entrega de drogas. Além de tanta experiência acumulada com sua biocompatibilidade *in vivo* estes dispositivos apresentam um histórico regulatório robusto, facilitando o surgimento de novas tecnologias para uso em humanos<sup>22</sup>.

Polímero	Acrônimo
Poliácido glicólico	PGA
Poliácido lático	PLA
Policaprolactona- $\epsilon$	PCL
Polivalerolactona	PVL
Poli-1,4-dioxane-2,3-diona	
Poli-1,3-dioxane-2-ona	
Poli-para-dioxanona	PDS
Poli-1,5-dioxepan-2-ona	PDXO
Poliácido- $\beta$ -R,S-málico	P- $\beta$ -MLA
Poliácido- $\alpha$ -málico	P- $\alpha$ -MLA

**Tabela 1** – Poliésteres alifáticos degradáveis.



Biopolímeros têm um complexo processo produtivo, possuem propriedades dificilmente reproduzíveis, podem ser imunogênicos e quase sempre são de difícil estocagem devido à sua sensibilidade à umidade. Idealmente devem ser biocompatíveis, biofuncionais, ter sua degradação em velocidade coordenada com a formação de neo-tecidos substitutos ao dispositivo implantado e sofrer eliminação do corpo humano após sua degradação. É interessante notar que dispositivos feitos de polímeros biodegradáveis inicialmente são encarados como biomateriais, mas acabam sendo eliminados através de pequenas moléculas, desta forma entrando para o campo dos princípios e regulações farmacológicas<sup>23</sup>.

O poliácido L-lático ou PLLA, que foi o biopolímero utilizado no dispositivo deste estudo, é um polímero semicristalino cuja cristalinidade e microestrutura são dependentes da deformação e condições térmicas aplicados durante seu processamento, e é o biopolímero mais comumente utilizado nas estruturas esqueléticas dos BRS na atualidade. Já o poliácido D,L-lático ou PDLLA é incapaz de formar estruturas cristalinas, e portanto constitui materiais amorfos. É preferencialmente usado para eluição de drogas nas superfícies dos BRS.

### **3 PLATAFORMAS VASCULARES ABSORVÍVEIS**

Plataformas vasculares bioabsorvíveis foram implantadas pela primeira vez em artérias coronárias de humanos em 1998<sup>24</sup>. São desenhadas para dar suporte radial aos leitos vasculares durante o processo cicatricial tissular, prevenindo remodelamento constritivo e recolhimento elástico do vaso. Na sequência sofrem reabsorção da sua estrutura, prevenindo no longo prazo a trombose e a reestenose que pode acontecer com o implante de *stents* metálicos permanentes<sup>25</sup>. Na atualidade, todas as plataformas vasculares bioabsorvíveis estudadas ou já em uso em humanos

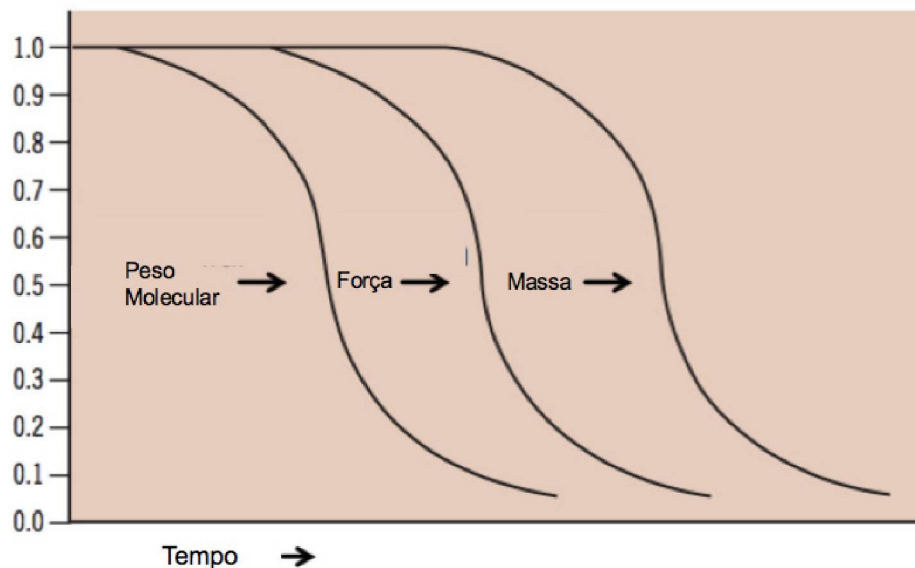
apresentam fármacos carregados em sua estrutura, visando diminuir taxas de reestenose intraluminal.

O polímero mais comumente usado em plataformas bioabsorvíveis é o PLLA e suas variações moleculares. Estes dispositivos constituem um grande desafio na condução de estudos pré-clínicos em animais, em especial nas avaliações e interpretações histopatológicas.

### **3.1 Biocompatibilidade**

O processo de bioabsorção das plataformas vasculares bioabsorvíveis está associado ao declínio gradual, no decorrer de meses ou anos, da força estrutural e da integridade da plataforma associado à resposta celular como a fagocitose, podendo gerar confusão na interpretação na eficácia e segurança do dispositivo.

As duas formas principais de degradação de polímeros cristalinos são a hidrólise e/ou reações enzimáticas. Geralmente a degradação inicia-se pela hidrólise: a água penetra na estrutura do dispositivo, quebra as ligações de éster dos poliácidos e converte longas cadeias de polímeros em cadeias curtas até pequenos fragmentos solúveis. Este processo acarreta a redução do peso molecular do dispositivo, porém sem a perda de sua capacidade estrutural (força radial), enquanto a plataforma ainda mantém seu esqueleto intacto. Em uma segunda fase é iniciada a degradação da estrutura por reações enzimáticas dos fragmentos residuais, resultando então em perda de massa do polímero<sup>26</sup> (Figura 1).



**Figura 1** – Esquema de degradação de polímeros: redução de peso molecular consequente à hidrólise seguida de perda de força estrutural. Posterior perda de massa do polímero por degradação por metabolismo enzimático.

Fonte: gráfico adaptado de Vorpahl M, Finn AV, Nakano M, Virmani R. The bioabsorption process: tissue and cellular mechanisms and outcomes. *EuroIntervention*. 2009;5 Suppl F:F28-35.

Após fase de hidrólise inicial e diminuição do peso molecular da plataforma bioabsorvível, observa-se sempre uma resposta inflamatória desencadeada pelo polímero, havendo um recrutamento de células com intuito final de eliminar o agente estranho, seguido de um processo cicatricial regenerativo. Este processo pode ser dividido em duas fases: 1) fase aguda; e 2) fase crônica.

A fase aguda é um processo inflamatório que pode durar de horas a dias, caracterizado pela formação de uma camada proteica sobre o biomaterial, consistido por sangue, albumina, fibrinogênio, fragmentos de complemento e anticorpos inespecíficos. Esta camada é o mediador da interação tecido-hospedeiro e a base para a reação de corpo estranho. Concomitantemente, o procedimento de implante desencadeia uma injúria microvascular e tecidual, que determina liberação de histamina e citocinas de mastócitos e dá início à migração de neutrófilos e macrófagos. Segue-se então um maior extravasamento de neutrófilos da corrente



sanguínea atraídos por aumento na expressão de moléculas de adesão naquele ambiente.

Durante a fase crônica ocorre uma mudança do processo inflamatório de neutrófilos para macrófagos ao redor do implante, sendo estas células encontradas desde semanas pós-implante até as fases finais de absorção. Macrófagos, como principais células mediadores das reações de corpo estranho, se fundem formando células gigantes na tentativa de fagocitar o material do corpo estranho. O microambiente tecidual e mediadores determinam a partir desta fase a diferenciação fenotípica dos macrófagos em fenótipos inflamatórios tipo I (M1) ou tipo II (M2). Macrófagos M2 são instrumentais na promoção da reparação tecidual, neovascularização, fagocitose e fibrose e este fenótipo de macrófago é o mais presente no tipo de reação de reabsorção de biomateriais.

### **3.2 Farmacocinética do sirolimus**

Apesar de resultados iniciais promissores em seguimento de 10 anos<sup>24</sup> da primeira plataforma bioabsorvível, a qual não carregava em sua estrutura qualquer tipo de fármaco anti-proliferativo, com o advento e resultados revolucionários dos stents farmacológicos os BRS caíram em descrédito e esquecimento<sup>27</sup>.

Já nos primórdios da era dos *stents* eluidores de droga em artérias coronárias, há quase 20 anos, a primeira droga utilizada naqueles dispositivos foi o sirolimus, fármaco de enfoque nesta tese por ser o carregado pelo dispositivo de nosso estudo. Trata-se de droga anti-rejeição primariamente utilizada para pacientes transplantados. Estudos tanto em animais quanto em humanos demonstraram sua eficácia na diminuição da reestenose intraluminal tanto a curto como a longo prazo após o implante de *stents* metálicos<sup>28</sup>. No entanto, os efeitos sistêmicos da droga aportada

na circulação sanguínea a partir dos *stents* ainda é tema de interesse. Estudos animais determinaram que, para que se obtivessem resultados consistentes de supressão da proliferação neointimal sem eventos adversos relacionados à droga, era necessário que a dose de sirolimus carregada por *stent* fosse de  $1,4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ , independente do número de *stents* implantados<sup>29</sup>.

Um estudo demonstrou padrões semelhantes tanto de farmacocinética como de *clearance* (renal e hepático) do sirolimus eluído a partir de *stents* implantados em leitos vasculares em comparação àqueles encontrados em pacientes transplantados que recebem a droga por via endovenosa ou oral. Porém a meia vida do sirolimus é maior quando por entrega via *stents*, refletindo provavelmente a liberação lenta da droga de seu polímero carreador e sua ligação ao tecido arterial<sup>30</sup>.

#### 4 TERAPIA DE RESTAURAÇÃO VASCULAR

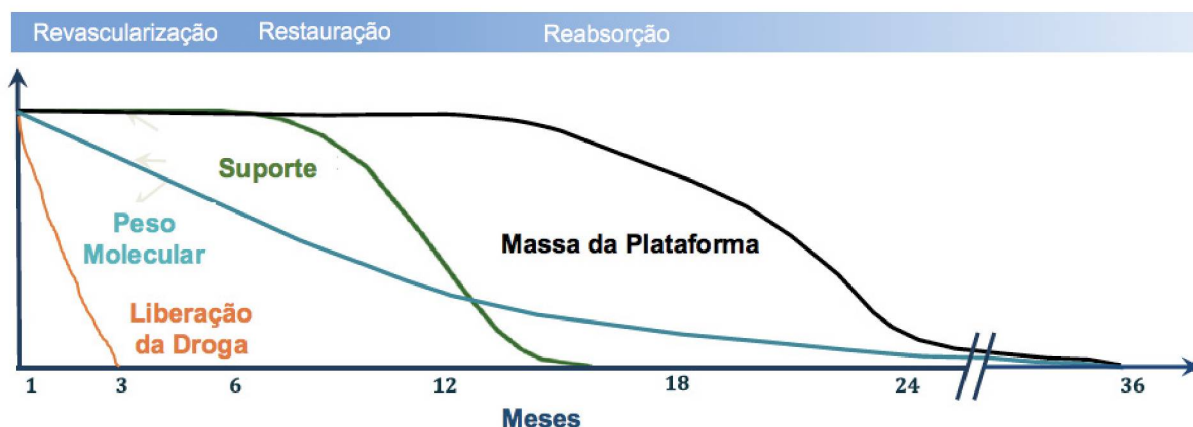
A evolução da terapia endovascular para DAP é alvo de investimentos em inovação em dispositivos médicos. Os principais objetivos a serem atingidos por estes dispositivos são: recuperar o vaso estenótico em seu calibre original, reestabelecer o seu fluxo sanguíneo e sua função endotelial fisiológica. Por fim, espera-se que os novos dispositivos eliminem a placa aterosclerótica formada e permitam que o vaso doente recupere suas condições funcionais originais. Com o surgimento das BRS, este conceito de terapia vem sendo amplamente discutido há cerca de duas décadas e foi denominado terapia de restauração vascular (TRV)<sup>31</sup>. Neste sentido, o termo plataforma (*scaffold*) como elemento estrutural temporário substituiu o *stent* e seu conceito de permanência.

O desenvolvimento de BRS faz-se desafiador levando-se em conta sua natureza temporária intrínseca. Seu desempenho (duração de força radial e

continuidade estrutural) deve estar alinhado ao seu comportamento fisiológico (estabilização luminal e seu processo de reabsorção).

O ciclo de vida dos BRS após seu implante é dividido em três fases: 1) revascularização; 2) restauração; e 3) reabsorção (Figura 2). São fases contíguas e intercaladas no tempo e determinantes dos requisitos fisiológicos para o sucesso no resultado final do implante. A fase final em que ocorre a degradação do material polimérico é dependente de sua constituição, neste trabalho PLLA e PDLA, além das características de espessura e desenho da plataforma. Estruturas cristalizadas ou amorfas (polímeros) são ao fim do processo reduzidas a moléculas menores (oligômeros ou monômeros), para então serem metabolizadas ou excretadas do corpo humano. Concomitante às três fases a seguir descritas ocorre a remodelação do vaso de forma contínua e dependente do sucesso deste processo evolutivo do implante<sup>32</sup>,

33.



**Figura 2** – Relação esquemática entre as três fases evolutivas e degradação por hidrólise pós-implante de um BRS de PLLA.

Fonte: gráfico adaptado de Oberhauser JP, Hossainy S, Rapoza RJ. Design principles and performance of bioresorbable polymeric vascular scaffolds. *EuroIntervention*. 2009;5 Suppl F:F15-22.

#### 4.1 Revascularização

Nesta fase, as propriedades mecânicas e a capacidade de entrega da droga carregada na plataforma são os pontos de importância. A fase de revascularização abrange desde o tempo da implantação do dispositivo, a resposta inflamatória inicial, até o início da perda de sua força radial. O BRS tem a mesma intenção de tratamento dos *stents* metálicos eluidores de drogas (DES): devem ter boa performance de entrega, ser expandidos a diâmetros determinados para recuperação luminal do vaso-alvo, e apresentar boa força radial para prevenção de retração aguda do vaso (*acute vessel recoil*) e remodelamento vascular negativo. A tecnologia para eluição de drogas destes dispositivos deve ser semelhante aos já consagrados DES, permitindo a liberação de fármacos para um período de 6 a 12 meses, prazo em que sabidamente pode ocorrer reestenose intra-luminal secundária à neoformação intimal. A força radial dos BRS deve ser mantida por no mínimo 3 meses, quando é esperado que o vaso não necessite mais deste apoio (até 6 meses), conforme demonstrado em literatura originada em implante destes dispositivos no leito coronariano<sup>34</sup>.

#### 4.2 Restauração

Esta fase é ativada ao iniciar-se a perda da integridade estrutural do BRS, mais especificamente a perda de sua capacidade de suporte e de sua continuidade estrutural. Vale ressaltar que perda de continuidade estrutural diferencia-se de fratura de hastes, evento que pode ocorrer durante a fase de revascularização por técnica inadequada de implante (hiperexpansão do dispositivo) ou falha mecânica estrutural. Ou seja, fratura de hastes é evento que ocorre antes da epiteliação do dispositivo gerando espículas intra-luminais descobertas. O sequestro endotelial das hastes dos BRS é definido por tomografia de coerência óptica (discutida mais adiante)



demonstrada em período de até 6 meses, prazo em que os BRS atuam similarmente como os DES<sup>34</sup>. Nesta fase inicia-se o dismantelamento da estrutura esquelética do BRS através de hidrólise molecular de suas estruturas poliméricas. O ritmo da degradação hidrolítica é que define o sucesso desta fase e a transição para a próxima.

### **4.3 Reabsorção**

Após a perda de sua capacidade de suporte radial e da sua continuidade estrutural, o BRS encontra-se com função inerte, e sua reabsorção deve ser de forma benigna, deixando o vaso tratado patente e com sua capacidade fisiológica recuperada. Esta fase deve ser lenta para que não haja um acúmulo de produtos a serem metabolizados, evitando-se assim inflamação exacerbada e comprometimento dos tecidos adjacentes ao implante. No caso de BRS de PLLA, a quebra das grandes moléculas de polímeros produz ácido láctico, que é facilmente metabolizado em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pelo Ciclo de Krebs, e eliminado pelos rins e pulmões. Estudos pré-clínicos já demonstraram que em média esta fase tem duração de 3 anos, comprovada por cromatografia (discutida adiante)<sup>35</sup>. O resultado de sucesso esperado após completada esta fase é a plena recuperação das características fisiológicas e da vasomotricidade do vaso, com mínimo risco de trombose tardia da plataforma.

## **5 OBJETIVOS**

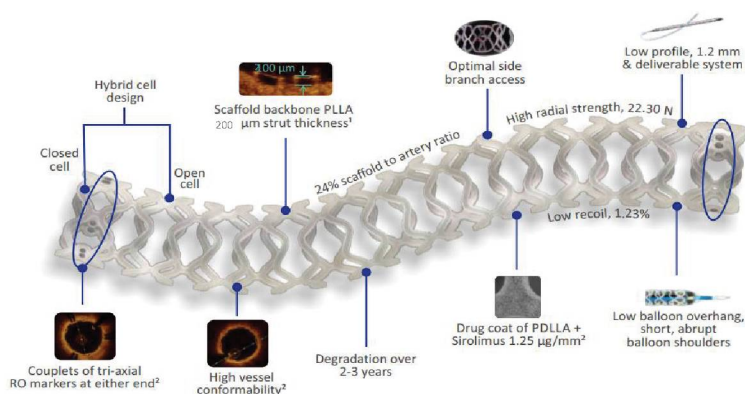
1. Analisar o desempenho de um novo dispositivo bioabsorvível para intervenção em leitos vasculares periféricos em um estudo pré-clínico de longo prazo (3 anos).
2. Avaliar resultados em segurança e biocompatibilidade do novo dispositivo.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Descrição do dispositivo investigado

O Credence BRS (Meril Life Sciences, Vapi – India) foi especificamente desenvolvido para o tratamento de DAP. É uma plataforma vascular bioabsorvível de poliácido-L-lático expansível por balão, recoberta por uma matriz de polímero anti-proliferativo carreador de droga (poliácido-D,L-lático + Sirolimus) na proporção polímero-droga de 1:1, resultando em uma concentração de droga de  $1,25 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ .

A espessura de hastes de  $200 \pm 20 \mu\text{m}$  do Credence BRS é maior que a das plataformas coronarianas atualmente presentes no mercado ( $<180 \mu\text{m}$ ), com o intuito de prover maior força radial, necessária para vasos periféricos. A plataforma apresenta um desenho de células híbridas, composto por coroas repetidas uniformemente orientadas em zigue-zague e conectadas entre si por hastes longitudinais. Nas extremidades proximal e distal as células são mais fechadas, e no corpo as células são abertas, para permitir melhor acesso a ramos secundários (Figura 3). Os tamanhos dos dispositivos usados neste estudo foram  $5,0 \times 15 \text{ mm}$ ,  $5,0 \times 17 \text{ mm}$ ,  $6,0 \times 15 \text{ mm}$  e  $6,0 \times 17 \text{ mm}$ .



**Figura 3** – ilustração e especificações do CREDENCE BRS (Meril Life Sciences, Vapi – India).

## 6.2 Desenho do Estudo

O estudo foi realizado no Skirball Center for Innovation (Orangeburg, NY – EUA), braço de estudos experimentais e testes pré-clínicos de dispositivos cardiovasculares da Cardiovascular Research Foundation (CRF) (Nova York, NY – EUA). Todos os cuidados com os animais internos daquela instituição são conduzidos de acordo com as normas do Conselho Americano de Pesquisas com Animais de Testes Laboratoriais<sup>36</sup>.

Quatorze plataformas bioabsorvíveis Credence BRS nas dimensões 5,0 x 15 mm, 5,0 x 17 mm, 6,0 x 15 mm e 6,0 x 17 mm foram implantadas em artérias ileofemorais de sete porcos Yucatan e o seguimento do estudo deu-se conforme tabela abaixo:

Procedimento	0d	30d	90d	180d	1a	2a	3a
Angiografia Quantitativa	X(7)	X(7)	X(7)	X(5)	X(3)	X(3)	X(2)
Implante da plataforma	X(7)						
Tomografia de Coerência Óptica	X(7)	X(7)	X(7)	X(5)	X(3)	X(3)	X(2)
Eutanásia			X(2)	X(2)		X(1)	X(2)
Histologia			X(2)	X(2)		X(1)	X(2)
Análise de peso Molecular							X(2)

**Tabela 2** – Procedimentos realizados durante os diferentes tempos do estudo, onde (\*) representa o número de animais.

## 6.3 Procedimento Intervencionista

Uma semana antes do procedimento administrou-se dose de ataque da terapia de dupla anti-agregação plaquetária composta por 300 mg de clopidogrel e 300 mg de ácido acetilsalicílico, seguida pela administração da dose de manutenção de clopidogrel 75 mg e ácido acetilsalicílico 81 mg diariamente, pelo prazo de 1 ano.

Os procedimentos foram realizados sob anestesia geral induzida por 4 a 5



mg/kg de xilazina intramuscular (IM) e 4 a 5 mg/kg de tiletamina/zolazepam IM, seguida de manutenção com isoflurano 1 a 5% via inalatória, após intubação orotraqueal. O acesso arterial foi obtido através de dissecação da artéria carótida (esquerda ou direita) seguida de passagem de introdutores 8 F através de técnica de Seldinger. A anticoagulação durante o procedimento foi feita com heparina não fracionada na dose de 100-200 U/Kg, mantendo-se o tempo de coagulação ativada (TCA), auferido a cada 30 minutos durante o procedimento, maior que 250 segundos. As artérias ilíacas foram canuladas com cateter *multipurpose* 8 F, e nitroglicerina foi administrada de forma intra-arterial para alívio e prevenção de vasoespasma. Foram realizadas as arteriografias de artérias ilíacas e femorais, seguidas de avaliação de angiografia quantitativa vascular (QVA). Utilizou-se o diâmetro médio do segmento de implante para escolha dos tamanhos das plataformas bioabsorvíveis a serem implantadas. Após a escolha do tamanho da plataforma, os BRS foram implantados através de técnicas *over the wire*, após a passagem de fio guia 0,014" mantido distalmente no vaso. Os sítios vasculares abordados foram as artérias ilíacas externas (direita ou esquerda) e as artérias femorais superficiais (direita ou esquerda). O implante se deu de forma gradual, com insuflações incrementais de 1-2 atmosferas a cada 2-3 segundos, até se atingir o diâmetro desejado da plataforma em uma relação de 20% plataforma-vaso, conforme especificação tabelada pelo fabricante. Seguindo o protocolo de estudos pré-clínicos, não se realizou pós-dilatação da plataforma, para se evitar injúria do vaso saudável e quebra da plataforma, fatores potencialmente prejudiciais a análises histopatológicas posteriores. Realizou-se na sequência a tomografia de coerência óptica, coletando-se as imagens para primeira avaliação do implante, presença de quebra de hastes, má expansão da prótese e posterior análise computacional. Retirou-se o fio-guia e o cateter *multipurpose* e finalizou-se o

procedimento com a ligadura da via de acesso, sutura de pele e curativos, com posterior encaminhamento do animal para a área de recuperação e cuidados pós-operatórios.

#### **6.4 Farmacocinética**

O Credence BRS tem sirolimus eluido sob PDLA em sua plataforma na concentração de  $1,25 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ . Em nosso estudo, a concentração de sirolimus sérico foi avaliada em 3 porcos Yucatan (6 Credence BRS). Amostras de sangue foram coletadas pré-procedimento e em 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 24 horas e 7, 14, 28, 60, 90 dias pós-procedimento. Foi utilizada a técnica de precipitação proteica seguida de extração sólida, e realizada análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CL-EM) com quantificação mínima determinada em 0,5 ng/ml. Para a análise farmacocinética temporal foi utilizado o software Phoenix WinNonlin Versão 6.3 (Pharsight Corporation, St. Louis/MO – EUA).

Em dois animais eutanasiados após 90 e 180 dias foi utilizado método de CL-EM para avaliação farmacocinética do sirolimus de 04 (quatro) Credence BRS em médio e longo prazo. Para realização dos exames foi utilizado serviço laboratorial terceirizado (Agilux Labs – Natick/MA – EUA).

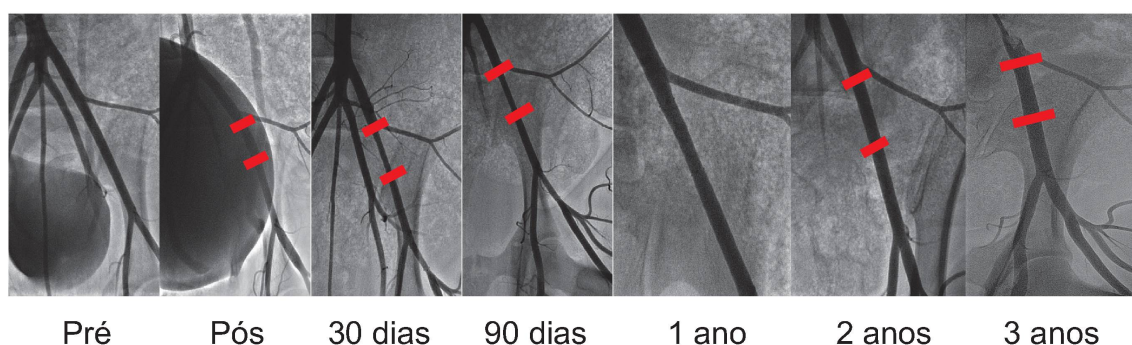
#### **6.5 Angiografia Vascular Quantitativa**

Os exames de imagem de angiografia simples e a análise de angiografia vascular quantitativa foram coletados nos seguintes tempos: pré-procedimento, pós-implante, 30 dias, 60 dias, 90 dias, 180 dias, 1 ano, 2 e 3 anos, tendo sido os espécimes examinados conforme demonstrado na Tabela 3.

Animal	Eutanásia	Ilíaca Direita		Ilíaca Esquerda		QVA					
		Distal	AFSD	Distal	AFSE	30d	90d	180d	1a	2a	3a
1	90 dias			6,0x17	5,0x17	X	X				
2	90 dias	6,0x15	5,0x15			X	X				
3	180 dias	6,0x17	5,0x15			X	X	X	X		
4	180 dias			6,0x17	5,0x15	X	X	X	X		
5	2 anos	6,0x15	5,0x17			X	X	X	X	X	
6	3 anos			5,0x17	5,0x15	X	X	X	X	X	X
7	3 anos			6,0x17	5,0x15	X	X	X	X	X	X

**Tabela 3** – Procedimentos de imagem realizados em tempos diferentes para grupos sobreviventes. QVA = *Angiografia Vascular Quantitativa*; AFSD = *artéria femoral superficial direita*; AFSE = *artéria femoral superficial esquerda*; dimensões das plataformas em milímetros.

Todas as imagens angiográficas (Figura 4) foram obtidas com aparelho de hemodinâmica Innova 3100 (General Electric, EUA) ou Artis Zee (Siemens, Alemanha) para posterior análise em software de angiografia vascular quantitativa QAngio XA Software 7.1.14.0 (Medis Medical Imaging System, Holanda) em estação de trabalho Siemens.



**Figura 4** – Animal 7, controle angiográfico pré e pós-implante de um Credence BRS 6,0 x 17 mm em artéria ilíaca externa esquerda. No detalhe em vermelho o local do implante.

## 6.6 Tomografia de Coerência Óptica

Os exames de imagem de tomografia de coerência óptica foram coletados nos seguintes tempos: pós-implante, 30 dias, 60 dias, 90 dias, 1 ano, 2 e 3 anos, tendo sido os espécimes examinados conforme demonstrado na Tabela 4.

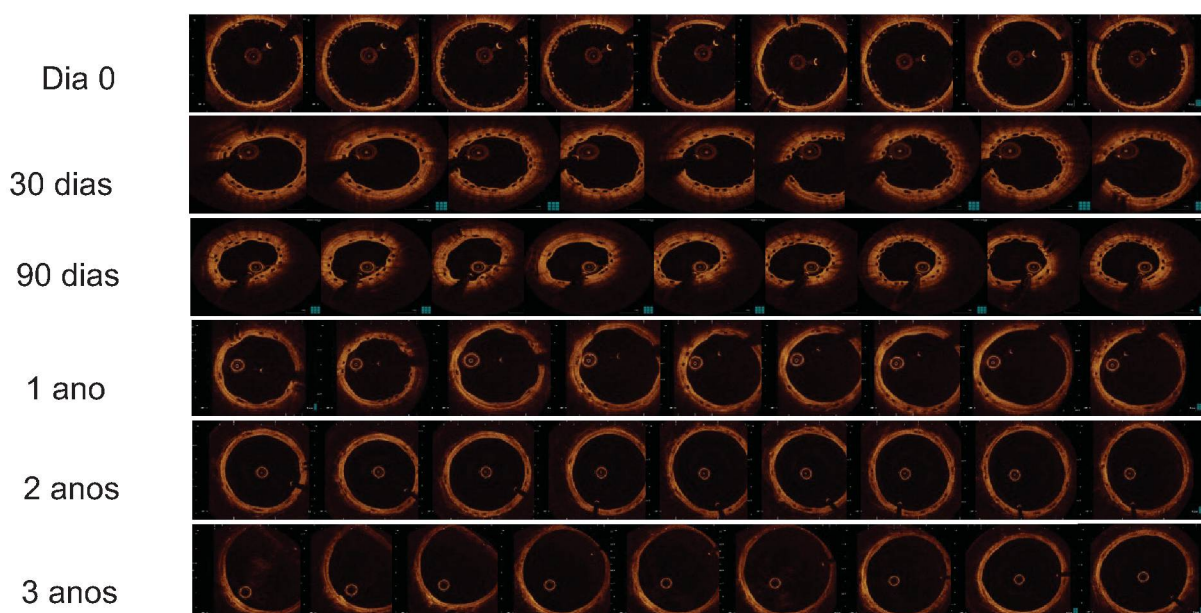
As imagens (Figura 5) foram obtidas com equipamento Ilumien PCI Optimization System (St. Jude Medical, St. Paul, MN – EUA) e cateter Dragonfly do mesmo fabricante, com a área de interesse de coleta de dados iniciando-se 5 mm distalmente à prótese e finalizando 5 mm proximal à plataforma bioabsorvível com mensuração das dimensões de referência nestes pontos. As imagens foram adquiridas em uma definição de 100 quadros/seg, com uma velocidade de 20mm/seg, obtida através de um pullback motorizado. A análise quantitativa foi realizada com o software ILUMIEN OPTIS (St. Jude Medical, St. Paul, MN – EUA) e, como realizado em análises de produto de referência de mercado<sup>37</sup>, foram analisadas imagens do corte transversal da prótese a cada 2 mm com definição de: 1) área luminal; 2) área interna e 3) externa da plataforma bioabsorvível; 4) porcentagem de estenose ( $1 - \frac{\text{área luminal} - \text{área interna da plataforma}}{\text{área luminal}}$ ) x 100 e; 5) espessura neointimal (distância entre a superfície interna da plataforma até a borda da área luminal). No decorrer do estudo a integração e absorção da plataforma foi analisada conforme a refletividade das hastes em cortes transversais classificadas na literatura<sup>37</sup> como “caixas”. Classificaram-se aquelas com bordas bem definidas e de alta refringência com conteúdo interno de baixa refringência como “caixa preservada”, aparência típica em fases precoces pós-implante. Conforme o material é degradado, este aspecto vai gradualmente se alterando do padrão acima, e passa a ser classificado como “outra caixa”. O número total de caixas foi então contado para cada tempo do estudo e foi



calculada a porcentagem de “caixas preservadas” versus “outras caixas”, usando o total como denominador.

Animal	Eutanásia	Ilíaca Direita		Ilíaca Esquerda		OCT					
		Distal	AFSD	Distal	AFSE	30d	90d	180d	1a	2a	3a
1	90 dias			6.0x17	5.0x17	X	X				
2	90 dias	6.0x15	5.0x15			X	X				
3	180 dias	6.0x17	5.0x15			X	X	X	X		
4	180 dias			6.0x17	5.0x15	X	X	X	X		
5	2 anos	6.0x15	5.0x17			X	X			X	
6	3 anos			5.0x17	5.0x15	X	X			X	X
7	3 anos			6.0x17	5.0x15	X	X			X	X

**Tabela 4** – Procedimentos de imagem realizados em tempos diferentes para grupos sobreviventes. *OCT = Tomografia de Coerência Óptica; AFSD = artéria femoral superficial direita; AFSE = artéria femoral superficial esquerda; dimensões das plataformas em milímetros.*



**Figura 5** – Animal 7, controle por tomografia de coerência óptica pós-implante de um Credence BRS 6,0 x 17 mm em artéria ilíaca externa esquerda.

## 6.7 Análise Histológica

No decorrer do tempo, isolar de forma histológica o dispositivo passa a ser uma grande dificuldade técnica. Enquanto *stents* metálicos são facilmente visualizados macroscopicamente em material de estudo, BRS são dificilmente visualizados, e a perda da sua força radial associada ao recolhimento elástico vascular *post mortem* podem falsear resultados de aferição das dimensões lumbais e parietais do vaso estudado. Esta limitação é mitigada através do uso de técnica de fixação pressurizada e de análise morfométrica quantitativa interpretada com critério e sempre comparada a dados da angiografia final<sup>25</sup>. Vale recordar que o recolhimento elástico dos vasos ocorre também longitudinalmente, e para tanto deve-se realizar sua fixação em suporte rígido. Estudos mal conduzidos podem falsear resultados de forma significativa, quando a técnica de coleta e fixação destes vasos não é realizada com técnica apropriada. Autoridades regulatórias geralmente requisitam marcadores estabelecidos de bioabsorção como por exemplo, 90% da absorção na linha do tempo.

A avaliação histológica de dispositivos vasculares bioabsorvíveis demanda mão de obra e laboratórios extremamente especializados. Existe pouca padronização de procedimentos e faltam documentos consensuais. A colaboração próxima entre engenheiros, cientistas de desenvolvimento de dispositivos e os patologistas com experiência em estudos experimentais é essencial. Otimizações e melhorias contínuas são necessárias frente a um mercado em constante mudança e ao desenvolvimento de novos materiais no campo das doenças vasculares<sup>25, 38</sup>.

Neste estudo foram avaliados por meio de microscopia e morfometria os seguintes aspectos da durabilidade e patência do Credence BRS:

1. Grau e uniformidade da cobertura neointimal e presença de hastes descobertas.
2. Presença de trombos na superfície luminal do dispositivo.
3. Má aposição tardia de hastes.
4. Cicatrização arterial e biocompatibilidade.

Os resultados foram conduzidos por laboratório independente de patologia experimental (Alizee Pathology, Thurmont/MD – EUA) e foram escolhidos os períodos de 90 e 180 dias, 2 e 3 anos pós-implante.

Todas as artérias incluídas no estudo, previamente dissecadas e fixadas em formalina tamponada foram seccionadas em cortes transversais. Foram incluídos em parafina, separadamente, cortes de cada uma das regiões, proximal e distal à plataforma (vaso referência) e corte central que continha a plataforma, avaliado em três pontos (proximal, médio e distal). Foram confeccionadas lâminas com cortes de 5 µm coradas por hematoxilina e eosina (H&E) e tricrômico de elastina (ET).

Vale ressaltar que a biocompatibilidade de biomateriais é avaliada em modelos animais por protocolos e modelos estabelecidos pela ISO 10993:2018<sup>39</sup>. Escores específicos de resposta de biocompatibilidade a seguir descritos, foram criados pela Annex (Animal Research Nexus, Exeter, Reino Unido), e são atualmente aceitos e padronizados pela indústria de dispositivos médicos e aceitos pelas agências reguladoras de implante de materiais médicos assim como incorporados pela ISO 10993 em suas duas últimas versões.

O estudo histopatológico do Credence BRS contemplou análise semi-quantitativa com escores variando de 0 a 4 (0=ausente, 1=mínimo, 2= discreto,



3=moderado, ou sem falhas na estrutura tecidual e 4=acentuado, ou causando falhas na estrutura tecidual) das seguintes variáveis: a) lesão da parede vascular, b) resposta inflamatória, c) evolução do processo cicatricial, d) reação da plataforma bioabsorvível e e) presença de outras alterações histológicas associadas (Figura 6).

a) Avaliação da lesão da parede vascular:

Utilizou critérios subjetivos de intensidade da injúria variando de 0 a 4 (0=ausente, 1=mínimo, 2= discreto, 3=moderado, 4=acentuado).

b) Resposta inflamatória:

Incluiu a avaliação semi-quantitativa das populações celulares: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, histiócitos e células gigantes do tipo corpo estranho em cada localização especificada, associada a plataforma, na região da neoíntima, na camada média, na adventícia/região perivascular e microgranulomas na região associada a plataforma.

Com o intuito de homogeneizar a avaliação semi-quantitativa da lesão da parede vascular e da resposta inflamatória em toda a extensão luminal de um corte histológico arterial, foram atribuídos escores para cada quadrante do vaso, seguindo sentido horário e rotulando os quadrantes como I, II, III e IV. O resultado final correspondeu a média dos escores dos quadrantes.

c) Evolução do processo cicatricial:

Incluiu a avaliação semi-quantitativa das variáveis: calcificação peri-plataforma, fibrina associada à plataforma, restos necróticos relacionados à plataforma, hastes desnudas, endotelização, erosão do endotélio, fibrina na neoíntima, maturidade da neoíntima, hipocelularidade da neoíntima, transudato fibrinoso na camada média, hipocelularidade da camada média, hipocelularidade da

**Figura 6** – Exemplos das variáveis histopatológica e morfométricas analisadas conforme tabela original do laboratório Alizée Pathology.

A avaliação morfométrica foi realizada através do programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Rockville, MD/EUA) obtendo-se as medidas das áreas em mm<sup>2</sup> da lâmina elástica interna (LEI), lâmina elástica externa (LEE) e da área luminal (AL). Considerou-se LEI a área delimitada pelo bordo da lâmina elástica interna, LEE área delimitada pelo bordo da lâmina elástica externa e AL a área luminal arterial. A partir dessas medidas diretas, foram calculados os demais parâmetros histomorfométricos como a medida das áreas, dos comprimentos e dos parâmetros de reestenose, conforme as fórmulas: Área neointimal (AN em mm<sup>2</sup>) = derivada da Área LEI - AL (área neointima baseada em LEI); Área Média (AM em mm<sup>2</sup>) = derivada da Área LEE - Área LEI; Diâmetro equivalente luminal (DL em mm) =  $2 \times \sqrt{(AL / \pi)}$ ; Diâmetro equivalente da LEI (diâmetro da LEI em mm) =  $2 \times \sqrt{(AL + AN) / \pi}$ ; Porcentagem da área de estenose (com base na área LEI) =  $(1 - \text{Área AL} / \text{LEI}) \times 100$ ; Espessura neointimal média (em  $\mu\text{m}$ ) =  $(\text{LEI} - \text{DL}) / 2 \times 1000$ .

## 6.8 Análise de Peso Molecular

Neste estudo, as características da degradação *in vivo* do Credence BRS foram analisadas em dois animais (duas plataformas) que sofreu eutanásia após 3 anos. O método utilizado para análise de perda do peso molecular foi de cromatografia de permeação em gel (GPC), e foi realizada em laboratório terceirizado (PolyAnalytik – London, Ontário/Canadá). O GPC é realizado após extração de resíduos de PLLA da plataforma da artéria dissecada. O instrumento usado para as análises de GPC foi a Bomba Integrada Viscotek GPCmax e uma matriz de detecção tripla modelo Viscotek Modelo 302 (TDA302). Os dados foram processados com o software OmniSEC 4.6.2 Build 359 (Malvern Instruments – Malvern/Reino Unido).

## 7 RESULTADOS

Será apresentado nas páginas seguintes o artigo científico com os Resultados e Discussão do estudo piloto pré-clínico, intitulado “**Long-Term performance and biocompatibility of a novel bioresorbable scaffold for peripheral arteries: A three-year pilot study in Yucatan miniswine**”, publicado em 16 de fevereiro de 2020 pela revista *Catheterization and Cardiovascular Interventions* (Qualis A3) 2020:1-8 (<https://doi.org/10.1002/ccd.28810>).



# Long-term performance and biocompatibility of a novel bioresorbable scaffold for peripheral arteries: A three-year pilot study in Yucatan miniswine

Gilberto Melnick MD<sup>1,2</sup> | Marco Ferrone MD, PhD<sup>1,3</sup> | Yanping Cheng MD<sup>1</sup> |  
Gerard B. Conditt RCIS<sup>1</sup> | Ênio E. Guérios MD<sup>2</sup> | Serge D. Rousselle DVM<sup>4</sup> |  
Juan F. Granada MD<sup>1</sup>  | Grzegorz L. Kaluza MD, PhD<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>CRF-Skirball Center for Innovation,  
Orangeburg, New York

<sup>2</sup>Universidade Federal do Parana, Curitiba,  
Brazil

<sup>3</sup>Universita degli Studi Federico II di Napoli,  
Naples, Italy

<sup>4</sup>Alizée Pathology, Thurmont, Maryland

## Correspondence

Grzegorz L. Kaluza MD, PhD, CRF Skirball  
Center for Innovation, 8 Corporate Drive,  
Orangeburg NY 10962, USA.  
Email: gkaluza@crf.org

## Funding information

Meril Life Sciences, Vapi, India

## Abstract

**Aims:** Peripheral arteries are constantly exposed to deformation (elongation, twisting, shortening, compression) making bioresorbable scaffolds (BRS) a potentially attractive therapeutic alternative to metallic stents. We conducted a long-term pilot pre-clinical study of a novel sirolimus-eluting BRS in peripheral arteries.

**Methods and results:** Fourteen BRS were deployed in iliofemoral arteries of seven healthy Yucatan miniswine and examined with imaging, pharmacokinetic, histopathologic, and polymer degradation techniques at 0, 30, 90, 180 days, 1, 2, and 3.3 years. Angiographic late luminal loss remained unchanged at 30 and 180 days but significantly decreased from 1 to 3.3 years. optical coherence tomography (OCT) showed late increase in lumen area (1 year:  $14.70 \pm 3.58 \text{ mm}^2$ , 2 years  $22.04 \pm 3.81 \text{ mm}^2$ , and 3.3 years  $23.45 \pm 7.07 \text{ mm}^2$ ;  $p < .05$ ) primarily due to scaffold area enlargement between 1 and 3.3 years, while there was no difference in the percent area stenosis at all time points. Histologic evidence of scaffold degradation was observed starting at 2 years, with minimal inflammatory reaction. At 3.3 years, BRS struts were rarely discernible by OCT, confirmed by a nearly complete polymer degradation by molecular weight analysis.

**Conclusions:** In this pilot study, novel sirolimus-eluting BRS showed promising acute and chronic performance in the iliofemoral arteries of Yucatan miniswine.

## KEYWORDS

animal, bioresorbable scaffold, histopathology, imaging, peripheral

**Abbreviations and acronyms (in order of appearance):** %AS, percent area stenosis; BRS, bioresorbable scaffolds; %DS, percent diameter stenosis; DES, drug-eluting stent; EEL, external elastic lamina; IEL, internal elastic lamina; GPC, gel permeation chromatography; LC-MS/MS, liquid chromatography mass spectrometry; MLD, minimal lumen diameter; NIT, neointimal thickness; OCT, optical coherence tomography; PAD, peripheral artery disease; PLLA, poly-L-lactic acid; QVA, quantitative vascular angiography; RVD, reference vessel diameter.

## 1 | INTRODUCTION

Percutaneous transluminal angioplasty for peripheral artery disease (PAD) is associated with improvements of quality of life and clinical outcomes, although the optimal standard of care is yet to be defined and recurrence rates are high.<sup>1</sup> Paclitaxel-coated balloons and drug-eluting stents (DES) have shown improvements in recurrence rates,<sup>2,3</sup> although the enthusiasm has been tempered by a recent mortality

controversy regarding paclitaxel,<sup>4,5</sup> renewing interest in the potential use of bioresorbable scaffolds (BRS) for the treatment of PAD.

Although the long-term outcomes of BRS in the coronary setting have been disappointing in comparison to metallic DES,<sup>6</sup> peripheral arteries have a different pathological (diffuse atherosclerosis with higher occurrence of chronic occlusions) and physiological (different healing and restenotic response) profile.<sup>7</sup> Hence, some of the presumed benefits of BRS like the restoration of artery plasticity and the capacity to improve lumen patency over time may still be attainable in PAD at a more favorable risk-to-benefit ratio than in the coronary arteries; however, there have been very few reports on peripheral use of BRS to date.<sup>8,9</sup> We conducted a preclinical pilot study evaluating operational performance, pharmacokinetics, and long-term durability and biocompatibility of a novel sirolimus-eluting balloon-expandable BRS (Credence BRS, Meril Life Sciences, Gujarat, India).

## 2 | METHODS

### 2.1 | Investigational device description

Specifically developed for PAD treatment, Credence BRS is balloon-expandable scaffold consisting of a poly-L-lactic acid (PLLA) backbone coated with a polymer-antiproliferative drug matrix (poly D, L-lactide + sirolimus) mixed in a 1:1 polymer to drug ratio, resulting in a surface drug concentration of 1.25 µg/mm<sup>2</sup>. The strut thickness is higher than a coronary BRS (200 ± 20 µm) in order to achieve radial force adequate for peripheral vessels. Credence BRS features a hybrid cell design consisting of repeated, uniformly oriented zigzag crowns connected by longitudinal links with closed cells at the edges (proximal and distal) and open cells along its body for optimal side branch access (Figure 1). The device sizes used in the study were 5.0 × 15 mm, 5.0 × 17 mm, 6.0 × 15 mm, and 6.0 × 17 mm.

### 2.2 | Study design

The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. All animals received the standard care in accordance with

the Animal Welfare Act and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.<sup>10</sup>

Fourteen sirolimus-eluting balloon-expandable Credence BRS were deployed in iliofemoral arteries of seven healthy Yucatan miniswine. Two animals each were sacrificed at 90 days and 180 days rendering two and two scaffolds, respectively, for histologic and sirolimus evaluation, one at 2 years for histology only (two scaffolds) and two at 3.3 years for histology (two scaffolds) and polymer degradation analysis (two scaffolds). The sequence of events in the study is summarized in Table 1.

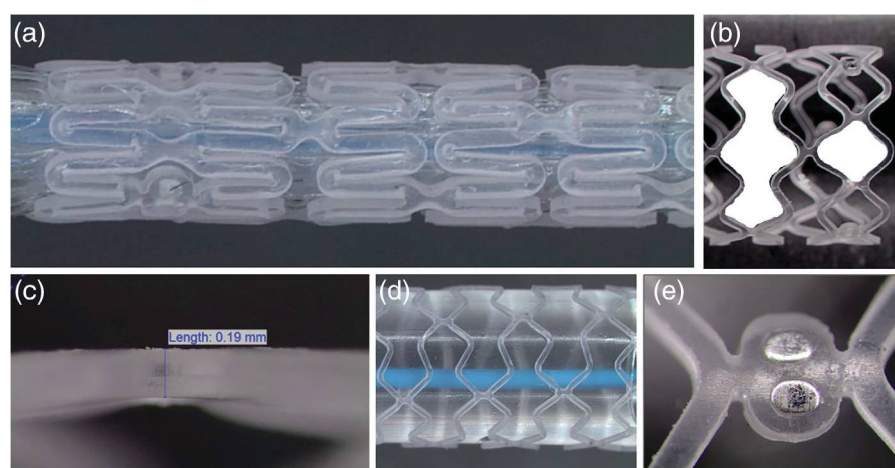
### 2.3 | Interventional procedure

Dual antiplatelet therapy consisting of clopidogrel (150 mg loading and 75 mg/d maintenance dose) and oral aspirin (325 mg loading and 81 mg/d maintenance dose) was initiated before procedure and maintained up to 1 year. General anesthesia was induced with xylazine and tiletamine/zolazepam, followed by intubation and isoflurane maintenance. Arterial access was obtained via the carotid artery cutdown and heparin (100–200 U/kg) was administered to maintain an activated clotting time >250 s.

Online quantitative vascular angiography (QVA) was used for scaffold sizing. Deployment of the BRS was done by balloon inflation with 1 atm increments every 2–3 s until obtaining complete scaffold expansion up to the target diameter (20% stent-to-artery overstretch ratio). Post-dilatation was not performed, as it is generally avoided in preclinical studies of stents and scaffolds implanted in normal vessels seeking consistent stent-to-artery oversizing ratio that minimizes variability in arterial injury between implanted devices and helps interpretation of histopathology data.

### 2.4 | Pharmacokinetics

The pharmacokinetic profile of the sirolimus release from Credence BRS (*n* = 4) was evaluated at 90 (*n* = 2) and 180 days (*n* = 2) using the liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS; Agilux Labs,



**FIGURE 1** Credence BRS design and features. (a) Crimped scaffold. (b) Hybrid design combining closed cells at the edges and open cells throughout the body. (c) Strut profile with thickness measurement. (d) Fully expanded scaffold with open cells facilitating side branch access. (e) Dual platinum-iridium markers placed tri-axially around the scaffold edges' circumference [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



**TABLE 1** Sequence of study events over 3 years of study's duration

Key study procedures	Time point						
	Day 0	30 Days	90 Days	180 Days	1 Year	2 Years	3.3 Years
Angiography	X n = 9	X n = 9	X n = 6	X n = 6	X n = 3	X n = 3	X n = 2
Scaffold deployment	X						
Optical coherence tomography	X n = 9	X n = 9	X n = 6	X n = 6	X n = 3	X n = 3	X n = 2
Euthanasia			X n = 3	X n = 3		X n = 1	X n = 2
Histology or sirolimus in tissue			X n = 3	X n = 3		X n = 1	X n = 2
Polymer molecular weight analysis							X n = 2

Natick, MA). Segments containing scaffold remnants were homogenized and extracted in organic solvents. Sirolimus in the arterial tissue extracts was analyzed by LC-MS/MS using ascomycin as the internal standard with the lower limit of quantitation of 50 ng/ml.

The sirolimus concentration in whole blood was evaluated in three pigs bearing six Credence BRS. Blood samples were collected pre-procedure and at 30 min, 1, 2, 4, 8, 24 hr, and 7, 14, 28, 60, 90 days post implant, using protein precipitation followed by a solid phase extraction procedure and analysis by LC-MS/MS. With the lower limit of quantitation was 0.5 ng/ml. Temporal analysis utilized the noncompartmental model of the Phoenix WinNonlin Version 6.3 software (Pharsight Corporation, St. Louis, MO).

## 2.5 | QVA

QVA analysis was performed using the QAngio XA Software™ 7.1.14.0 (Medis Medical Imaging System, Leiden, the Netherlands). Minimum lumen diameter (MLD) was obtained from the single worst view, while the reference vessel diameter (RVD) was automatically calculated by the interpolation method. Percent diameter stenosis (%DS) was calculated from the relation between MLD and the RVD.

## 2.6 | OCT imaging

OCT images were recorded using the ILUMIEN PCI Optimization System (St Jude Medical, St Paul, MN). Motorized OCT pullbacks were performed at a rate of 20 mm/s and acquired at 100 frames/second. Quantitative analyses were performed with the commercial software (ILUMIEN OPTIS; St. Jude Medical, St. Paul, MN), and the lumen area, the inner and outer scaffold area were measured. Percent area stenosis (%AS) was calculated as  $[1 - (\text{lumen area} / \text{inner scaffold area})] \times 100$ . Neointimal thickness (NIT) was measured as the distance from the inner surface of the scaffold struts to the luminal border.

As established for ABSORB BVS (Abbott Vascular), changes in appearance of BRS struts in serial OCT are reflective of scaffold degradation and integration.<sup>11</sup> Scaffold cross-sections were evaluated every 2 mm and the number of "preserved boxes" (OCT strut footprint with sharply defined borders with bright reflection, while the strut body shows low reflection, typical of early post-implant appearance) and "other boxes"

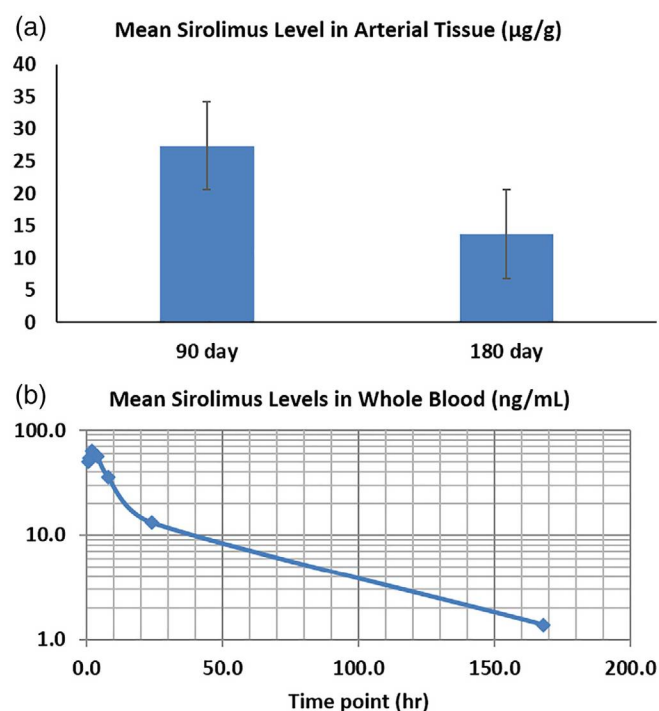
(not conforming to the above description) were counted for every scaffold (Figure 4). A number of visible struts/cross-section/scaffold was assessed as a surrogate for scaffold integration into the arterial wall. Total number of boxes were then calculated for each time point (days 0, 1, 2, and 3.3 years) and the percentage of preserved versus other boxes calculated using the total as the denominator.

## 2.7 | Histological analysis

An independent laboratory (Alizee Pathology, LLC, Thurmont, MD) conducted the histopathologic analysis. The vessels were removed by standard surgical technique, rinsed in Lactated Ringer's solution and fixed in 10% neutral buffer formalin. The stented regions were trimmed, processed, embedded in Spurr resin, sectioned to include proximal, middle, and distal in-stent cross-sections, stained with hematoxylin and eosin and elastin trichrome, and examined via light microscopy. Cross-sectional areas, including external elastic lamina (EEL), internal elastic lamina (IEL), and lumen area of each section were measured. %AS was calculated as  $[1 - (\text{lumen area} / \text{IEL area})] \times 100$ . Qualitative histological assessment of healing was performed using standardized score system.<sup>12</sup> Peristrut inflammation was evaluated for each individual strut with the following grading: 0 = no inflammatory cells surrounding the strut; 1 = light, non-circumferential lymphohistiocytic infiltrate surrounding the strut; 2 = localized, moderate to dense cellular aggregate surrounding the strut non-circumferentially; and 3 = circumferential dense lymphohistiocytic cell infiltration of the strut. The average inflammatory score for each cross section was calculated by dividing the sum of inflammatory scores by the total number of struts at the examined section.<sup>13</sup> Furthermore, qualitative histological assessment included analysis of the uniformity and maturity of neointimal coverage, fibrin deposition neointimal and adventitial inflammation, and acquired malapposition.

## 2.8 | Polymer molecular weight and concentration analysis

The in vivo degradation characteristics including molecular weight distribution, scaffold mass loss, and molecular weight loss of the investigational PLLA scaffolds were assessed at the 3.3 years follow-up by size exclusion/gel permeation chromatography (GPC) at PolyAnalytik



**FIGURE 2** Pharmacokinetic data showing sirolimus release profile. (a) Sirolimus concentrations in the arterial tissue at 90 and 180 days after Credence BRS implantation (b) sirolimus levels in whole blood over time [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

(London, Ontario, Canada). Subsequently to the extraction procedure of PLLA scaffold from the explanted stented artery, the GPC was performed on each sample. The instrument used for all GPC analysis consisted of a Viscotek GPCmax integrated pump, autosampler, and degasser unit and a Viscotek Triple Detection Array Model 302 (TDA302) equipped with an oven that houses the detectors. Data were processed with the OmniSEC software 4.6.2 Build 359 (Malvern Instruments).

## 2.9 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SAS statistical software (version 9.4; SAS Institute Inc. NC). All measurements were expressed as mean  $\pm$  SD. The change in continuous outcomes over the seven time periods (0, 30, 90, 180 days, 1, 2 and 3 years) was compared using analysis of variance for repeated measurements. The differences were considered significant only if calculated  $p$  value was  $<.05$ .

## 3 | RESULTS

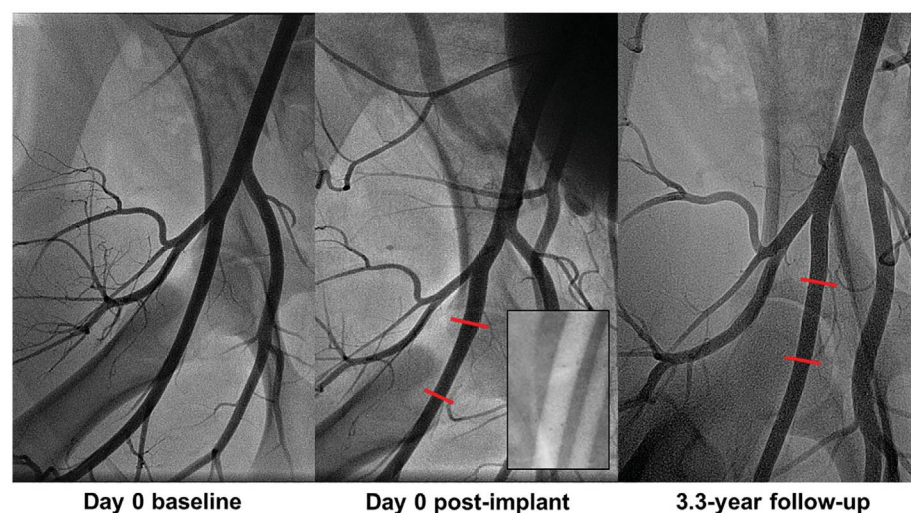
### 3.1 | Pharmacokinetics

Results of the pharmacokinetic analysis are summarized in Figure 2. The sirolimus arterial tissue concentration gradually

**TABLE 2** Summary of key QVA results

Credence BRS	Post-implant	30 Days	90 Days	180 Days	1 Year	2 Years	3 Years	$p$ Value
RVD, mm	$4.34 \pm 0.76$	$4.45 \pm 0.69$	$4.61 \pm 0.52$	$4.71 \pm 0.63$	$5.07 \pm 0.59$	$5.48 \pm 1.27$	$4.51 \pm 1.09$	.08
MLD, mm	$4.64 \pm 0.60$	$3.00 \pm 0.72$	$3.02 \pm 0.52$	$3.19 \pm 0.64$	$3.98 \pm 0.53$	$5.24 \pm 1.05$	$4.51 \pm 0.85$	$<.01$
% Diameter stenosis	n/a	$33.04 \pm 9.56$	$34.96 \pm 6.79$	$32.63 \pm 7.08$	$21.54 \pm 6.40$	$3.74 \pm 4.61$	$-1.04 \pm 10.57$	$<.01$
Late lumen loss, mm	n/a	$1.65 \pm 0.43$	$1.69 \pm 0.41$	$1.29 \pm 0.22$	$0.66 \pm 0.54$	$-0.61 \pm 0.85$	$0.23 \pm 1.05$	$<.01$

Abbreviations: MLD, minimum lumen diameter; QVA, quantitative vascular angiography; RVD, reference vessel diameter.

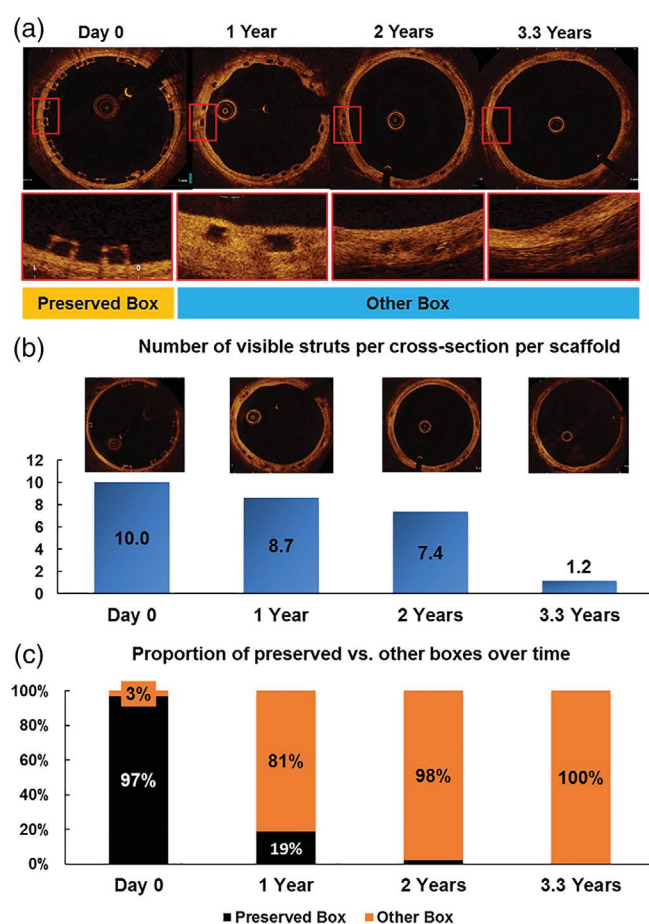


**FIGURE 3** Representative sequential angiograms from baseline to 3.3-year follow-up. The insert in the middle panel shows sets of triple markers at both edges of the scaffold in digital subtraction mode angiography [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



**TABLE 3** Summary of key optical coherence tomography (OCT) measurements

	Post-implant	30 Days	90 Days	180 Days	1 Year	2 Years	3.3 Years	p Value
Reference area, mm <sup>2</sup>	15.00 ± 4.22	15.15 ± 3.52	15.17 ± 4.08	15.56 ± 5.91	17.84 ± 3.88	21.24 ± 4.10	21.27 ± 7.81	<.05
Lumen area, mm <sup>2</sup>	17.03 ± 3.99	9.66 ± 3.99	9.87 ± 3.30	10.06 ± 4.33	14.70 ± 3.58	22.04 ± 3.81	23.45 ± 7.07	<.01
Scaffold area, mm <sup>2</sup>	20.33 ± 4.43	12.80 ± 4.27	13.34 ± 3.25	14.39 ± 5.44	19.18 ± 3.79	27.58 ± 4.64	28.29 ± 7.63	<.01
Area of stenosis, %	0	26 ± 7	27 ± 9	31 ± 9	24 ± 4	19 ± 4	18 ± 4	<.05
Neointimal thickness, mm	0	0.11 ± 0.04	0.13 ± 0.07	0.17 ± 0.09	0.17 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.28 ± 0.04	<.01

**FIGURE 4** (a) Representative optical coherence tomography (OCT) cross sections from day 0 post-implant to 3.3 years and the corresponding “box” appearances. (b) Decline of number of identifiable struts in OCT images over the study duration. (c) Decline of “preserved box” presence from 97% on day 0 post-implant to complete absence at 3.3 years [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

declined over time. At 180 days, it was about 50% lower than at 90 days but still present in the arterial wall (Figure 2a). Peak drug concentration in blood was observed at 1–4 hr post implant, with an average peak concentration of sirolimus of  $63.5 \pm 5.67$  ng/ml. The blood levels of sirolimus quickly declined to below the limit of quantification after 14 days (Figure 2b).

### 3.2 | Quantitative vascular angiography

Baseline average vessel diameters were comparable among all animals (mean baseline MLD:  $4.40 \pm 0.76$  mm,  $p = .099$ ), and so was the extent of balloon injury achieved in all animals (mean balloon to artery ratio:  $1.11 \pm 0.16$ ,  $p = .381$ ), and there were no differences in the post-implant MLD between the scaffolds (mean post-implant MLD:  $4.64 \pm 0.60$  mm,  $p = .124$ ). No post-dilatation was performed in any case. Angiographic data over all follow-up time points are summarized in Table 2. There was a significant lumen gain during the analyzed time interval, eventually manifested at a lumen patency equivalent to those in the adjacent reference segment (%DS at 3.3 years:  $-1.04 \pm 10.57\%$ ,  $p < .01$ ). This was also manifested by changes in late lumen loss and MLD over the studied time period. Representative angiographic images over the course of 3.3 years are presented in Figure 3.

### 3.3 | OCT imaging

OCT results are summarized in Table 3. At the early time points (30–180 days), there was a significant decrease in the lumen area, resulting both from reduction of the scaffold area and from neointimal proliferation. Between 180 days and 2 years, the average lumen area increased over time, at a rate matching the increments in scaffold area and also in the reference area (due to artery growth typical for the model), after which the increase plateaued between 2 and 3.3 years. Changes in NIT and %AS over time are also shown in Table 3.

The OCT hallmarks of scaffold integration into the arterial wall started to be evident at 1 year and very advanced at 3.3 years (Figure 4). Immediately after implantation, all struts had a preserved box appearance (Figure 4a—day 0) and were well apposed to the vessel wall; the strut footprints were increasingly less distinct over time. The numbers of recognizable struts per cross section per scaffold has dropped radically by the study's end (Figure 4b). At day 0, 97% of struts presented a preserved box appearance, while only 3% had “other” presentation. At 1 year, on average, the proportion was 81–19%. At 3.3 years, no preserved boxes were present in any of the scaffolds.

### 3.4 | Histological analysis

All struts were covered at all time-points with minimal asymmetry. There was no evidence of luminal thrombosis in either the main or the side



**FIGURE 5** Representative histologic cross sections from the four examined time points. Note significant degradation-related artifacts affecting the appearance of the scaffolds at 2- and 3.3-year time points related to scaffold: the cross-sectional dimensions are reduced as a result of the loss of radial support by a degraded scaffold, the patency appears deteriorated, the neointima thickened, and the struts remnants swollen. This is in contrast to the in vivo appearance captured on optical coherence tomography (OCT) and presented in Figure 4 [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

	90 Days	180 Days	2 Years	3.3 Years	p Value
Lumen area, mm <sup>2</sup>	4.74 ± 4.78	4.38 ± 2.29	6.27 ± 3.28	3.64 ± 2.47	.80
IEL area, mm <sup>2</sup>	8.79 ± 4.00	7.41 ± 1.92	11.15 ± 3.08	8.84 ± 3.23	.99
EEL area, mm <sup>2</sup>	10.69 ± 4.79	9.16 ± 2.45	13.63 ± 3.77	11.2 ± 3.44	.91
Neointimal area, mm <sup>2</sup>	4.05 ± 0.78	3.03 ± 0.37	4.88 ± 0.20	5.21 ± 1.02	.33
Neointimal thickness, mm	0.52 ± 0.29	0.37 ± 0.11	0.49 ± 0.12	0.59 ± 0.11	.78
Uncovered struts, %	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	–
Neointima inflammation	1.50 ± 0.71	0.35 ± 0.49	0.35 ± 0.49	0.00 ± 0.00	–
Adventitia inflammation	0.30 ± 0.00	0.15 ± 0.21	0.35 ± 0.49	0.00 ± 0.00	–
Fibrin deposition	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.21	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	–

**TABLE 4** Histomorphometry and semiquantitative histological features at termination

Abbreviations: EEL, external elastic lamina; IEL, internal elastic lamina.

branches. The vascular healing response appeared adequate in all implanted Credence BRS based on coverage of the struts by fully mature, fibro-muscular, and endothelialized neointima with no residual fibrin and no thrombosis. The neointimal and adventitial inflammation was benign up to 2 years and completely absent at 3.3 years. There was no evidence of acquired scaffold malapposition or any uncovered struts.

In regard to resorption, there was no substantial evidence of it by 180 days. The process started being discernible at 1 year and at 2 years the strut degradation was appreciable by hyaline hydrolysis of the polymer and partial hyaline substitution of the scaffold struts. Scaffolds harvested at 3.3 years demonstrated advanced biodegradation as illustrated by strut erosion, prominent hyaline hydrolysis of the polymer, and evident fragmentation and phagocytosis. Overall, the healing features and patency characteristics recorded at 3.3 years were very consistent with data recorded at earlier time periods. Representative cross sections illustrating the histologic changes in response to Credence BRS at the four time points examined are shown in Figure 5. Key histomorphometric and biologic indices of arterial response to Credence BRS over time are summarized in Table 4.

### 3.5 | Molecular weight and concentration analysis

In polymer extracts from the scaffolded segments harvested at 3.3 years, there was no detectable light scattering signal due to the

low molecular weight of the residual PLLA. In contrast, PLLA peaks were successfully detected by the refraction index detector. The GPC-Refractory Index profile and area of the PLLA in the extracts was quantifiable and the results were reproducible between injections and within the different extracts. The relative molecular weight averages of PLLA were successfully calculated for all extracts. The control undegraded scaffolds had a molecular weight of 173,882 ± 6,284 Da. The overall molecular weight of the PLA extracted from the scaffolded segments was 5,461 ± 323 Da, which represents a 96.81% ± 0.19% decrease in molecular weight compared to naïve (undegraded) scaffolds, suggesting that polymer degradation was nearly complete in the arteries tested.

## 4 | DISCUSSION

This long-term pilot preclinical study of a novel sirolimus-eluting BRS demonstrated encouraging early evidence of sustained patency and biocompatibility out to 3.3 years of follow-up, when the scaffolds were nearly completely degraded and their remnants well integrated into the walls of iliofemoral arteries of Yucatan miniswine.

In the context of PAD, theoretical benefits of BRS resulting from programmed degradation over time remain very appealing. Metallic stents feature elevated risk for fracture and restenosis in this biomechanically challenging environment, compounded by often chronically



occluded and/or long lesions,<sup>14</sup> even in the DES era.<sup>15</sup> In a recent benchtop study, none of the 12 peripheral self-expanding metallic stents demonstrated superior characteristics under all deformation modes and many experienced global buckling and diameter pinching.<sup>16</sup> A follow-up study in cadaveric legs showed that none of the tested seven stents was able to fully conform to the anatomically natural deformations.<sup>17</sup> Therefore, restoration of near-natural artery plasticity following BRS resorption, after the strong radial support is no longer needed and the restenosis is contained, would be expected to remedy the chronic artery irritation by a permanent metallic implant which can never be mechanically and biologically neutral to the artery.

Initial experiences with non-drug eluting BRS yielded comparable immediate angiographic results to metal stents, but improvements of mechanical characteristics and addition of an antiproliferative drug appeared necessary to reduce the restenosis rate during the resorption period.<sup>18,19</sup> A more refined drug-eluting BRS technology in the form of coronary ABSORB BVS was used in the below the knee territory with sustained good results out to 3 years.<sup>8</sup> The only dedicated BRS for peripheral use demonstrated favorable results out to 2 years in a first-in-human study,<sup>9</sup> but overall progress has been slow, proving that a quick transformation of technically viable coronary BRS technology into peripheral application is not warranted.

The core coronary BRS technology used as a starting point for the peripheral device examined in the present study has been commercially available in select geographies and studied clinically in a coronary and below-the-knee indications.<sup>20,21</sup> To scale the device up for iliofemoral use while ensuring adequate acute and chronic radial support, strut thickness was nearly doubled. In this first in vivo use in normal porcine arteries, a significant lumen loss and decrease in scaffold area at the early time point of 30 days were observed in comparison to post-implant. Although OCT and histology did not reveal any evident mechanical failures (i.e., fractures, dismantling, malapposition), early recoil likely occurred. However, the patency was minimally impacted as the degree of stenosis was moderate, and from 1 year onward positive remodeling ensued, restoring the scaffold and lumen area to nearly post-implant levels, with additional gains at 2 and 3.3 years. Also, the collective imaging, histology, and polymer concentration data suggest a similar resorption timeline of the study BRS in comparison to the benchmark ABSORB BVS,<sup>11</sup> although even longer time point(s) would be necessary to show the resorption and integration process 100% complete. Sirolimus concentrations in the arterial wall were similar at 90 days but somewhat higher at 180 days than previously reported for the coronary MeRes scaffold.<sup>22</sup> This may be a consequence of a larger surface area and higher absolute mass of sirolimus delivered from a much larger device. However, it remains unclear whether relatively higher concentration at 180 days also means higher retention at later time points, as they were not examined; whole blood levels were very similar at 180 days between the two scaffold variants.

Qualitative histopathologic indices years of healing and scaffold resorption assessed at two early and two late time points over 3.3 years suggest satisfactory integrity and healing, and adequate biocompatibility of the implants. Of note, the histomorphometric indices

of arterial patency were generally discrepant and much less favorable than those measured by OCT, which is a phenomenon recognized in previous studies of BRS.<sup>23</sup> Reflecting the programmed loss of radial support which is an expected consequence of device bioabsorption, the previously scaffolded segment regains its inherent elasticity and can recoil upon loss in blood pressure postmortem. Behaving similarly to a nonstented artery, the segment is fixed, processed, and measured with altered (lower) dimensions when compared to the in vivo dimensions. This in turn artificially reduces lumen size and increases percent stenosis values. As a consequence, high relative stenosis in histomorphometry is not indicative of compromised patency in vivo and should always be viewed in against in-vivo imaging data.

## 4.1 | Limitations

Two main limitations of this study are worth highlighting. One, the sample size was small, although owing to multiple techniques employed, it was sufficient to provide a fairly complete initial insight throughout nearly entire lifetime of the device. Also, past experience with BRS failures indicates that long-term follow-up is of utmost importance, and this was made the study's top priority within the available resources. Second, the study lacks a comparator device, but it has to be acknowledged that no suitable comparator (peripheral balloon-expandable BRS) has been available to date, while comparisons to metallic DES are of limited value biologically due to fundamentally different nature of total body degradation of BRS. Third, lack of atherosclerosis and challenging biomechanical environment in the arterial segments available for the study in the animal model limits the clinical applicability of the findings, although the normal model was entirely appropriate for the first-ever in-vivo evaluation's comparative purpose.

## 5 | CONCLUSIONS

This long-term small experimental feasibility and proof of principle study provided preliminary evidence of acceptable durability and satisfactory biocompatibility of peripheral Credence BRS over 3.3 years after implantation in iliofemoral arteries of Yucatan miniswine.

### CONFLICT OF INTEREST

The study was sponsored by Meril Life Sciences, Vapi, India in form of a research contract to Cardiovascular Research Foundation.

### DISCLOSURE OF INTEREST

Drs. Rousselle, Granada, and Kaluza were recipients of institutional research grants from Meril Life Sciences that provided financial support for majority of the work described in the manuscript.

### ORCID

Juan F. Granada  <https://orcid.org/0000-0003-2399-8320>

Grzegorz L. Kaluza  <https://orcid.org/0000-0001-6915-5033>



## REFERENCES

1. Antonopoulos CN, Mylonas SN, Moulakakis KG, et al. A network meta-analysis of randomized controlled trials comparing treatment modalities for de novo superficial femoral artery occlusive lesions. *J Vasc Surg*. 2017;65:234-245.
2. Kayssi A, Al-Jundi W, Papia G, et al. Drug-eluting balloon angioplasty versus uncoated balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis of the femoropopliteal arteries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;1:CD012510.
3. Gray WA, Keirse K, Soga Y, et al. A polymer-coated, paclitaxel-eluting stent (eluvia) versus a polymer-free, paclitaxel-coated stent (Zilver PTX) for endovascular femoropopliteal intervention (IMPERIAL): a randomised, non-inferiority trial. *Lancet*. 2018;392:1541-1551.
4. Katsanos K, Spiliopoulos S, Kitrou P, Krokidis M, Karnabatidis D. Risk of death following application of paclitaxel-coated balloons and stents in the femoropopliteal artery of the leg: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(24):e011245.
5. Freisinger E, Koeppe J, Gerss J, et al. Mortality after use of paclitaxel-based devices in peripheral arteries: a real-world safety analysis. *Eur Heart J*. 2019;ehz698. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz698>.
6. Stone GW, Kimura T, Gao R, et al. Time-varying outcomes with the Absorb bioresorbable vascular scaffold during 5-year follow-up: a systematic meta-analysis and individual patient data pooled study. *JAMA Cardiol*. 2019;4:1261. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2019.4101>.
7. Iida O, Uematsu M, Soga Y, et al. Timing of the restenosis following nitinol stenting in the superficial femoral artery and the factors associated with early and late restenoses. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2011;78:611-617.
8. Varcoe RL, Thomas SD, Lennox AF. Three-year results of the Absorb everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold in infrapopliteal arteries. *J Endovasc Ther*. 2018;25:694-701.
9. Lammer J, Bosiers M, Deloose K, et al. Bioresorbable everolimus-eluting vascular scaffold for patients with peripheral artery disease (ESPRIT I): 2-year clinical and imaging results. *JACC Cardiovasc Interv*. 2016;9:1178-1187.
10. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press; 2011.
11. Onuma Y, Serruys PW, Perkins LE, et al. Intracoronary optical coherence tomography and histology at 1 month and 2, 3, and 4 years after implantation of everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds in a porcine coronary artery model: an attempt to decipher the human optical coherence tomography images in the ABSORB trial. *Circulation*. 2010;122:2288-2300.
12. Yazdani SK, Pacheco E, Nakano M, et al. Vascular, downstream, and pharmacokinetic responses to treatment with a low dose drug-coated balloon in a swine femoral artery model. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2014;83:132-140.
13. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:224-230.
14. Tosaka A, Soga Y, Iida O, et al. Classification and clinical impact of restenosis after femoropopliteal stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:16-23.
15. Iida O, Takahara M, Soga Y, et al. The characteristics of in-stent restenosis after drug-eluting stent implantation in femoropopliteal lesions and 1-year prognosis after repeat endovascular therapy for these lesions. *JACC Cardiovasc Interv*. 2016;9:828-834.
16. Maleckis K, Deegan P, Poulson W, et al. Comparison of femoropopliteal artery stents under axial and radial compression, axial tension, bending, and torsion deformations. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017;75:160-168.
17. MacTaggart J, Poulson W, Seas A, et al. Stent design affects femoropopliteal artery deformation. *Ann Surg*. 2019;270:180-187.
18. Werner M, Micari A, Cioppa A, et al. Evaluation of the biodegradable peripheral Igaki-Tamai stent in the treatment of de novo lesions in the superficial femoral artery: the GAIA study. *JACC Cardiovasc Interv*. 2014;7:305-312.
19. Werner M, Schmidt A, Scheinert S, et al. Evaluation of the biodegradable Igaki-Tamai scaffold after drug-eluting balloon treatment of de novo superficial femoral artery lesions: the GAIA-DEB study. *J Endovasc Ther*. 2016;23:92-97.
20. Seth A, Onuma Y, Chandra P, et al. Three-year clinical and two-year multimodality imaging outcomes of a thin-strut sirolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold: MeRes-1 trial. *EuroIntervention*. 2019;15:607-614.
21. Parikh SA, on behalf of CREDENCE BtK Study Investigators. 12-Month clinical outcomes of sirolimus-eluting bioresorbable peripheral scaffold system in arteries below the knee. <https://www.tctmd.com/slide/12-month-clinical-outcomes-sirolimus-eluting-bioresorbable-peripheral-scaffold-system>. Accessed October 29, 2019.
22. Gasior P, Cheng Y, Xia J, et al. Two-year longitudinal evaluation of a second-generation thin-strut sirolimus-eluting bioresorbable coronary scaffold with hybrid cell design in porcine coronary arteries. *Cardiol J*. 2018;30:155861. <https://doi.org/10.5603/CJ.a2018.0095>.
23. Gogas BD, Radu M, Onuma Y, et al. Evaluation with in vivo optical coherence tomography and histology of the vascular effects of the everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold at two years following implantation in a healthy porcine coronary artery model: implications of pilot results for future pre-clinical studies. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2012;28:499-511.

**How to cite this article:** Melnick G, Ferrone M, Cheng Y, et al. Long-term performance and biocompatibility of a novel bioresorbable scaffold for peripheral arteries: A three-year pilot study in Yucatan miniswine. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2020;1-8. <https://doi.org/10.1002/ccd.28810>

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe na atualidade um grande volume de pesquisas pela busca por dispositivos de tratamento para doença aterosclerótica estenosante (coronária ou vascular periférica) que proporcionem a restauração da atividade fisiológica do vaso sem deixar metal em seu leito. As plataformas bioabsorvíveis constituídas de PLLA são as mais exploradas na atualidade. A partir da hidrólise e posterior degradação desencadeada por princípios inflamatórios, estas plataformas tendem a desaparecer idealmente do corpo humano em cerca de 3 anos após seu implante.

Leitos vasculares periféricos têm características próprias com estresse mecânico contínuo responsáveis por reestenose e fratura de *stents* metálicos, trazendo a ideia de que os BRS sejam uma alternativa de grande apelo na terapêutica endovascular destes vasos quando afetados por doença aterosclerótica. O desafio de encontrar o melhor *design*, a espessura e forma de hastes sem perder força radial e os tempos de reabsorção do dispositivo são os focos de pesquisa da indústria especializada no tema.

Neste estudo pudemos analisar os resultados de testes pré-clínicos de uma plataforma já disponível comercialmente em alguns mercados, porém com indicação de uso apenas em artérias coronárias e artérias periféricas abaixo dos joelhos. Após o redimensionamento do Credence BRS para os leitos fêmoro-poplíteos, este estudo preliminar demonstrou haver a esperada biocompatibilidade, ganho de diâmetro luminal no longo prazo e resultados histopatológicos e farmacocinéticos compatíveis com BRS de referência já em uso em humanos. As limitações deste estudo são as inerentes da equiparação de estudos pré-clínicos em artérias saudáveis de animais e sua tradução em segurança e eficácia ao serem usadas em terapêutica endovascular de mundo real.

A durabilidade da patência dos vasos tratados é o tendão de Aquiles da terapia endovascular para a DAP. Os resultados desfavoráveis obtidos pelo primeiro BRS com eluição de droga usado em artérias coronárias (e sua consequente retirada do mercado) atrasaram as pesquisas na área de biopolímeros dedicados, o que prejudicou estudos em leitos vasculares periféricos. Lições importantes sobre o desenho e a espessura das hastes das plataformas e sua influência em induzir trombose assim como os tempos de degradação dos dispositivos devem ser entendidas antes que a tecnologia chegue ao mercado. Ressaltamos que as diferentes características entre leitos vasculares periféricos e coronários, incluindo os padrões de fluxo, a constituição da parede dos vasos, e as características díspares da doença aterosclerótica, devem ser consideradas a fim de que as pesquisas em ambos os campos tenham olhares diferentes, porém buscando resultados semelhantes no longo prazo.

Não existem dúvidas de que resultados de estudos experimentais realizados em artérias de animais não podem ser automaticamente extrapolados para a doença aterosclerótica em humanos, e portanto, estudos pré-clínicos podem apenas demonstrar a segurança dos dispositivos e não sua eficácia. No entanto, estudos pré-clínicos em animais têm algum valor preditivo porque o processo de reparação arterial é semelhante. Portanto, estes estudos são importantes para se certificar que a tecnologia seja segura e o seu desempenho adequado, gerando a hipótese de que seu comportamento pode ser semelhante em humanos. Antes que estes dispositivos cheguem aos leitos vasculares de pacientes com DAP, devemos ter segurança a respeito das respostas biológicas dos BRS baseadas em ciência sólida e robusta.



## REFERÊNCIAS

1. NORGREN L; HIATT WR; DORMANDY JA; *et al.* Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). **J Vasc Surg.** Jan 2007;45 Suppl S:S5-67.
2. OLIN JW; SEALOVE BA. Peripheral artery disease: current insight into the disease and its diagnosis and management. **Mayo Clin Proc.** Jul 2010;85(7):678-92.
3. GERHARD-HERMAN MD; GORNIK HL; BARRETT C; *et al.* 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. **Circulation.** Mar 2017;135(12):e686-e725.
4. TENDERA M; ABOYANS V; BARTELINK ML; *et al.* ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur Heart J.** Nov 2011;32(22):2851-906.
5. KAYSSI A; AL-ATASSI T; OREOPOULOS G; ROCHE-NAGLE G; TAN KT, RAJAN DK. Drug-eluting balloon angioplasty versus uncoated balloon angioplasty for peripheral arterial disease of the lower limbs. **Cochrane Database Syst Rev.** Aug 2016;(8):CD011319.
6. KATSANOS K; SPILIOPOULOS S; PARASKEVOPOULOS I; DIAMANTOPOULOS A; KARNABATIDIS D. Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials of Paclitaxel-Coated Balloon Angioplasty in the Femoropopliteal Arteries: Role of Paclitaxel Dose and Bioavailability. **J Endovasc Ther.** Apr 2016;23(2):356-70.
7. TEPE G; ZELLER T; ALBRECHT T; *et al.* Local delivery of paclitaxel to inhibit restenosis during angioplasty of the leg. **N Engl J Med.** Feb 2008;358(7):689-99.
8. WERK M; ALBRECHT T; MEYER DR; *et al.* Paclitaxel-coated balloons reduce restenosis after femoro-popliteal angioplasty: evidence from the randomized PACIFIER trial. **Circ Cardiovasc Interv.** Dec 2012;5(6):831-40.
9. KATSANOS K; SPILIOPOULOS S; KITROU P; KROKIDIS M; KARNABATIDIS D. Risk of Death Following Application of Paclitaxel-Coated Balloons and Stents in the Femoropopliteal Artery of the Leg: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **J Am Heart Assoc.** 12 2018;7(24):e011245.

10. GRAY WA; JAFF MR; PARIKH SA *et al.* Mortality Assessment of Paclitaxel-Coated Balloons: Patient-Level Meta-Analysis of the ILLUMENATE Clinical Program at 3 Years. **Circulation**. Set 2019;140(14):1145-1155.
11. ANTONOPOULOS CN; MYLONAS SN; MOULAKAKIS KG; *et al.* A network meta-analysis of randomized controlled trials comparing treatment modalities for de novo superficial femoral artery occlusive lesions. **J Vasc Surg**. Jan 2017;65(1):234-245.e11.
12. DIAMANTOPOULOS A; KATSANOS K. Atherectomy of the femoropopliteal artery: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Cardiovasc Surg (Torino)**. Oct 2014;55(5):655-65.
13. WISSGOTT C; KAMUSELLA P; LÜDTKE C; ANDRESEN R. Excimer laser atherectomy after unsuccessful angioplasty of TASC C and D lesions in femoropopliteal arteries. **J Cardiovasc Surg (Torino)**. Jun 2013;54(3):359-65.
14. MCCASLIN JE; ANDRAS A; STANSBY G. Cryoplasty for peripheral arterial disease. **Cochrane Database Syst Rev**. Aug 2013;(8):CD005507.
15. WERNER M; MICARI A; CIOPPA A; *et al.* Evaluation of the biodegradable peripheral Igaki-Tamai stent in the treatment of de novo lesions in the superficial femoral artery: the GAIA study. **JACC Cardiovasc Interv**. Mar 2014;7(3):305-12.
16. WERNER M; SCHMIDT A; SCHEINERT S; *et al.* Evaluation of the Biodegradable Igaki-Tamai Scaffold After Drug-Eluting Balloon Treatment of De Novo Superficial Femoral Artery Lesions: The GAIA-DEB Study. **J Endovasc Ther**. Feb 2016;23(1):92-7.
17. SETH A; ONUMA Y; COSTA R; *et al.* First-in-human evaluation of a novel poly-L-lactide based sirolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold for the treatment of de novo native coronary artery lesions: MeRes-1 trial. **EuroIntervention**. Jul 2017;13(4):415-423.
18. SERRUYS PW; CHEVALIER B; SOTOMI Y; *et al.* Comparison of an everolimus-eluting bioresorbable scaffold with an everolimus-eluting metallic stent for the treatment of coronary artery stenosis (ABSORB II): a 3 year, randomised, controlled, single-blind, multicentre clinical trial. **The Lancet**. 11 2016;388(10059):2479-2491.
19. KEREIAKES DJ; ELLIS SG; METZGER C; *et al.* 3-Year Clinical Outcomes With Everolimus-Eluting Bioresorbable Coronary Scaffolds: The ABSORB III Trial. **J Am Coll Cardiol**. Dec 2017;70(23):2852-2862.
20. ONUMA Y; ORMISTON J; SERRUYS PW. Bioresorbable scaffold technologies. **Circ J**. 2011;75(3):509-20.



21. SHMITT EE; POLISTANA RA; COMPANY. AC; SURGICAL SUTURES. Patent application **US Patent no. 3297033A**. 1963.
22. VAN ALST M; EENINK MJ; KRUFTH MA; VAN TUIL R. ABC's of bioabsorption: application of lactide based polymers in fully resorbable cardiovascular stents. **EuroIntervention**. Dec 2009;5 Suppl F:F23-7.
23. VERT M. Bioabsorbable polymers in medicine: an overview. **EuroIntervention**. Dec 2009;5 Suppl F:F9-F14.
24. NISHIO S, KOSUGA K; IGAKI K; *et al*. Long-Term (>10 Years) clinical outcomes of first-in-human biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents: Igaki-Tamai stents. **Circulation**. May 2012;125(19):2343-53.
25. ROUSSELLE SD; RAMOT Y; NYSKA A; JACKSON ND. Pathology of Bioabsorbable Implants in Preclinical Studies. **Toxicol Pathol**. 04 2019;47(3):358-378.
26. VORPAHL M; FINN AV; NAKANO M; VIRMANI R. The bioabsorption process: tissue and cellular mechanisms and outcomes. **EuroIntervention**. Dec 2009;5 Suppl F:F28-35.
27. JINNOUCHI H; TORII S; SAKAMOTO A; KOLODZIE FD; VIRMANI R; FINN AV. Fully bioresorbable vascular scaffolds: lessons learned and future directions. **Nat Rev Cardiol**. 05 2019;16(5):286-304.
28. SOUSA JE; COSTA MA; SOUSA AG; *et al*. Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. **Circulation**. Jan 2003;107(3):381-3.
29. SUZUKI T; KOPIA G; HAYASHI S; *et al*. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. **Circulation**. Sep 2001;104(10):1188-93.
30. VETROVEC GW; RIZIK D; WILLIARD C; SNEAD D; PIOTROVSKI V; KOPIA G. Sirolimus PK trial: a pharmacokinetic study of the sirolimus-eluting Bx velocity stent in patients with de novo coronary lesions. **Catheter Cardiovasc Interv**. Jan 2006;67(1):32-7.
31. WYKRZYKOWSKA JJ; ONUMA Y; SERRUYS PW. Vascular restoration therapy: the fourth revolution in interventional cardiology and the ultimate "rosy" prophecy. **EuroIntervention**. Dec 2009;5 Suppl F:F7-8. doi:10.4244/EIJV5IFA1
32. KOSSUTH MB; PERKINS LEL; RAPOZA RJ. Design Principles of Bioresorbable Polymeric Scaffolds. **Interv Cardiol Clin**. Jul 2016;5(3):349-355.
33. OBERHAUSER JP; HOSSAINY S; RAPOZA RJ. Design principles and performance of bioresorbable polymeric vascular scaffolds. **EuroIntervention**. Dec 2009;5 Suppl F:F15-22.

34. SERRUYS PW; ONUMA Y; GARCIA-GARCIA HM; *et al.* Dynamics of vessel wall changes following the implantation of the absorb everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold: a multi-imaging modality study at 6, 12, 24 and 36 months. **EuroIntervention**. Mar 2014;9(11):1271-84.
35. ONUMA Y; SERRUYS PW. Bioresorbable scaffold: the advent of a new era in percutaneous coronary and peripheral revascularization? **Circulation**. Feb 2011;123(7):779-97.
36. National Research Council (US) Committee for the Update of the **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
37. ONUMA Y; SERRUYS PW; PERKINS LE; *et al.* Intracoronary optical coherence tomography and histology at 1 month and 2, 3, and 4 years after implantation of everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds in a porcine coronary artery model: an attempt to decipher the human optical coherence tomography images in the ABSORB trial. **Circulation**. Nov 2010;122(22):2288-300.
38. ROUSSELLE SD; WICKS JR; TABB BC; TELLEZ A; O'BRIEN M. Histology Strategies for Medical Implants and Interventional Device Studies. **Toxicol Pathol**. 04 2019;47(3):235-249.
39. **ISO 10993-1:2018**. Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process.